

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Monika Fikejzlová

**Acelulární test genotoxicity komplexních směsí organických látek
vázaných na velikostně segregovaných aerosolech**

**An acellular genotoxicity assay of complex mixtures of organic
compounds bound on size segregated aerosols**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Rössner Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7.7.2011

Podpis:

Finanční podpora

Tato diplomová práce byla provedena v rámci grantu (SP/1a3/149/08) Ministerstva životního prostředí ČR, Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (grant 2B08005) a Akademie věd ČR (grant AVOZ 50390512).

Poděkování: Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Pavlu Rössnerovi, Ph.D. za jeho podporu a mnoho cenných rad při vedení diplomové práce a MUDr. Radimu Šrámovi, DrSc. za možnost provedení této práce v laboratoři genetické ekotoxikologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd. Dále děkuji Ing. J. Topinkovi, Dr.Sc. za pomoc a připomínky k interpretaci výsledků a RNDr. J. Hovorkovi, Ph.D. a Ing. J. Kroužkovi za poskytnuté vzorky použité v této diplomové práci. Velký dík patří také RNDr. J. Schmuczerové, Ph.D. a Mgr. A. Milcové za pomoc při teoretickém i praktickém zvládnutí veškerých použitých metod.

OBSAH

ABSTRAKT	6
1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1. Prachové částice (PM, particulate matter)	10
3.2. Volatilní organické látky (VOC - volatile organic compounds)	12
3.3. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	12
3.4. DNA adukty	15
3.4.1. PAU a vznik DNA aduktů	17
3.4.1.1. PAU-DNA adukty in vitro	17
3.4.1.2. PAU-DNA adukty in vivo	20
3.4.2. Vliv expozice komplexním směsím PAU z ovzduší na tvorbu DNA aduktů	21
3.5. Oxidační stres	28
3.5.1. Oxidační poškození DNA	30
3.5.1.1. Oxidační poškození DNA ve zvířecích a in vitro modelech	30
3.5.1.2. Oxidační poškození DNA v lidském organismu a in vivo populační studie	34
4. MATERIÁL A METODY	37
4.1. Odběr vzorků z ovzduší, příprava EOM	37
4.2. In vitro acelulární test, ³² P-postlabeling	37
4.2.1. Princip stanovení DNA aduktů polyaromatických látek („bulky aromatic aducts“) metodou ³² P-postlabelingu	38
4.2.2. Postup stanovení DNA aduktů polyaromatických látek metodou ³² P-postlabelingu	39
4.3. ELISA	42
4.3.1. Postup stanovení oxidačního poškození DNA metodou ELISA	42
5. VÝSLEDKY	44
5.1. DNA adukty	44
5.2. Oxidační poškození	45
6. DISKUZE	47
6.1. DNA adukty	47
6.2. Oxidační poškození	49

7. ZÁVĚR	52
8. SEZNAM ZKRATEK	54
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
10. PŘÍLOHY: TABULKY	70
11. PŘÍLOHY: GRAFY	72
12. PŘÍLOHY: OBRÁZKY	81

ABSTRAKT

Hlavním cílem této práce bylo porovnat genotoxicitu organických extraktů z prachových částic různé velikosti (1-10 μm ; 0,5-1 μm ; 0,17-0,5 μm) odebraných velkoobjemovými kaskádními impaktory ve 4 lokalitách České republiky s různým stupněm znečištění (Březno – povrchový důl, Dobré Štěstí – dálnice, Praha – centrum, Láz – pozadřová stanice). Genotoxicita byla stanovena v acelulárním testu DNA z telecího brzlíku (calf thymus DNA; CT-DNA) s a bez metabolické aktivace S9, analýzou DNA aduktů indukovaných extrahovatelnou organickou hmotou (EOM) z prachových částic (PM) metodou ^{32}P -postlabeling a schopností extraktů indukovat oxidační poškození DNA, které bylo hodnoceno pomocí testu kompetitivní ELISA.

Hlavním závěrem této práce je, že největší podíl na genotoxicitě mají jemné částice ($<1 \mu\text{m}$). Koncentrace karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (k-PAU) v EOM ukazuje, že jemná frakce (0,5-1 μm) váže nejvyšší množství k-PAU ve všech odebíraných lokalitách. Tento fakt může souviset s vyšším měrným povrchem této frakce ve srovnání s hrubou frakcí (1-10 μm) a vyšší hmotností ve srovnání s kondenzační frakcí (0,17-0,5 μm). Jemná frakce i kondenzační frakce jsou účinné nosiče k-PAU. Podobně, hladiny DNA aduktů na m^3 vzduchu byly nejvyšší pro jemnou frakci, zatímco u kondenzační frakce (Březno, Praha) byly hladiny DNA aduktů nejvyšší v případě, kdy byla vzata v úvahu hmotnost aerosolu. Byla nalezena silná korelace mezi k-PAU a hladinami DNA aduktů indukovaných EOM ve všech lokalitách a pro různé velikosti frakce.

Metabolická aktivace S9 zvýšila oxidační kapacitu PM, průměrné hodnoty 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosinu (8-oxodG)/ 10^5 dG na 1000 m^3 vzduchu u vzorků s a bez metabolické aktivace byly 0,093 a 0,067 ($p < 0,05$). Byl pozorován významný pozitivní vztah mezi koncentrací k-PAU vázaných na PM a hladinami 8-oxodG/ 10^5 dG na 1000 m^3 po metabolické aktivaci vzorků EOM. Tato korelace byla slabší a nesignifikantní pro vzorky bez metabolické aktivace. Organické extrakty z PM byly schopné vyvolat oxidační poškození DNA in vitro a tato schopnost byla zvýšena po metabolické aktivaci S9 EOM a s klesající velikostí PM.

Klíčová slova: Znečištění ovzduší, Prachové částice, Komplexní směsi, Adukty DNA, Genotoxicita, PAU, Oxidační poškození DNA, Calf thymus DNA

ABSTRACT

The main aim of this work was to compare the genotoxicity of organic extracts from different size fractions of aerosol particles (1-10 μm , 0,5-1 μm , 0,17-0,5 μm) collected by high volume cascade impactors in various localities of the Czech Republic differing in the extent of the environmental pollution (Březno – strip mine, Dobré Štěstí – highway, Praha – city center, Láz – background station). Genotoxicity was determined in acellular assay of calf thymus DNA (CT-DNA) with and without S9 metabolic activation by analysis of DNA adducts induced by extractable organic matter (EOM) from the particulate matter (PM) by ^{32}P -postlabeling and the ability of extracts to induce oxidative DNA damage was evaluated using the competitive ELISA test.

The main finding of this work is that most of the observed genotoxicity is connected with fine particles ($<1\ \mu\text{m}$). The concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (c-PAHs) in EOMs indicate that fine fractions bound the highest amount of c-PAHs in all sampling sites. This fact might be related to a higher specific surface of this fraction as compared with a coarse fraction and a higher mass as compared with a condensational fraction. As for aerosol mass, both fine and condensational fractions are effective carriers of c-PAHs. Similarly, the DNA adducts levels per m^3 of air were highest for the fine fraction, while the condensational fraction (Březno, Praha) revealed the highest DNA adduct levels in cases where aerosol mass is taken into consideration. A strong correlation was found between the c-PAHs and DNA adduct levels induced by EOMs in all the localities and for various size fractions.

S9 metabolic activation increased the oxidative capacity of PM, mean levels of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)/ 10^5 per 1000 m^3 of air for samples with and without metabolic activation were 0,093 and 0,067 ($p < 0,05$). A significant positive association between concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to PM and levels of 8-oxodG/ 10^5 dG per 1000 m^3 of air after metabolic activation of EOM samples was observed. This correlation was weaker and nonsignificant for the samples without metabolic activation. Organic extracts of PM were able to induce oxidative damage to DNA in vitro and this ability was increased after metabolic activation of EOM and with decreasing sizes of PM.

Keywords: Air pollution, Particulate matter, Complex mixtures, DNA adducts, Genotoxicity, PAHs, Oxidative damage to DNA, Calf thymus DNA

1. ÚVOD

Znečištění ovzduší představuje v České republice dlouhodobý problém. V některých průmyslových oblastech patřilo znečištění ovzduší v 70. a 80. letech 20. století mezi nejhorší v Evropě. Po roce 1989 byla zavedena ochranná opatření zejména v energetice a dalších průmyslových odvětvích a došlo tak k poklesu znečištění ovzduší řady látek (SO_2 , prachových částic, oxidy dusíku). Bohužel po roce 2000 došlo k zpětnému procesu a koncentrace znečišťujících látek opět vzrostly.

Většina obyvatel je každodenně vystavena cizorodým látkám antropogenního původu. Tyto látky se nacházejí ve vodě, půdě, potravinách a také ovzduší. Kromě běžných škodlivin, jako jsou např. oxidy dusíku, oxidy síry, toxické kovy a prachové částice, se v ovzduší vyskytuje na deset tisíc různých organických látek, jejichž koncentrace jsou současnými standardními analytickými metodami odhalitelné.

Tyto organické látky jsou dvojího typu – volatilní (benzen, toluen, etan, metan), které se vyskytují ve formě par, a nevolatilní, které jsou navázány na prachových částicích (polycyklické aromatické uhlovodíky neboli PAU a jejich deriváty). Kromě organických látek se mohou na prachové částice vázat i látky anorganické, především toxické kovy (rtuť, olovo, kadmium).

Polycyklické aromatické uhlovodíky mají genotoxický účinek, protože jsou schopné se kovalentně navázat na DNA a tím dají vzniknout tzv. DNA aduktům. Tento proces změny genetického materiálu může aktivovat protoonkogeny, nebo tumor-supresorové geny a způsobit transformaci normální buňky v buňku nádorovou. Zjištění přítomnosti DNA aduktů přispívá k včasnému odhalení začátku karcinogenního procesu (Harris, 1991; Nesnow et al., 1998b).

Zároveň další studie naznačují, že některé kovy nebo organické látky, navázané na prachové částice zmíněné výše, mohou katalyzovat oxidační poškození DNA (Knaapen, 2002; Prahalad et al., 2001; Hanzalova et al., 2010).

Proto se v současné době studiu toxických účinků látek v ovzduší věnuje mnoho výzkumných pracovišť po celém světě, včetně České republiky. Nadále tak probíhá monitorování kvality ovzduší ve městech a průmyslových zónách za účelem zjištění vlivu znečištění na zdraví dané populace.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je porovnat s použitím acelulárního testu s nativní DNA (s a bez metabolické aktivace S9) genotoxicitu extrahovatelné organické hmoty (EOM, z angl. extractable organic matter) z prachových částic (PM, z angl. particulate matter) různé velikosti (1-10 μm ; 0,5-1 μm ; 0,17-0,5 μm) odebraných velkoobjemovými kaskádními impaktory ve 4 různých lokalitách České republiky s rozdílným stupněm znečištěného ovzduší. Odběr vzorků probíhal během zimy 2009, kdy bylo očekáváno vyšší znečištění ovzduší.

V první části byly EOM získané ze vzorků aerosolu analyzovány z hlediska obsahu karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (k-PAU). Genotoxicita byla stanovena analýzou DNA aduktů metodou ^{32}P -postlabeling. Ve druhé části se hodnotila schopnost extraktů indukovat oxidační poškození DNA s předpokladem, že oxidační kapacita PM extraktů bude vyšší u vzorků odebraných v oblastech s vyšším znečištěním a že menší velikost frakce PM bude větším induktorem oxidačního poškození DNA než frakce o větší velikosti částic. Rozsah oxidačního poškození byl analyzován pomocí testu kompetitivní ELISA.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Studium biologických účinků aerosolů zahrnuje celou řadu přístupů ke studiu genotoxicity. Genotoxicita je nejčastěji spojována s chemickými látkami vázanými na povrchu částic, nebo s působením částic samotných (Karlsson et al., 2004). Některé studie prokázaly genotoxické účinky k-PAU a jejich derivátů přítomných v organické frakci prachových částic (Topinka et al., 2000; Binkova et al., 2004; Lewtas, 2007), jiné zase naznačují, že některé kovy přítomné v prachových částicích mohou katalyzovat oxidační poškození DNA (Pralhad et al., 2001; Ghio et al., 1999).

3.1. Prachové částice (PM, particulate matter)

Prachové částice jsou významným rizikovým faktorem působícím na lidské zdraví. Velikost a složení částic je ovlivněno zdrojem, ze kterého pochází. Částice působí i jako nosič pro další toxické látky. Účinek závisí na jejich velikosti, tvaru a chemickém složení. Velikost částic je rozhodující pro průnik a ukládání v dýchacím traktu. Větší částice jsou zachyceny v horních cestách dýchacích, odkud jsou částečně vykašlány a částečně spolknuty. Prachové částice zvyšují celkovou nemocnost i úmrtnost. Podílejí se zejména na onemocnění srdce a cév. Snížená funkce plic při spirometrickém vyšetření u dětí i dospělých zvyšuje spotřebu léků pro rozšíření průdušek při dýchacích obtížích u astmatiků a zkracuje délku života (vyšší úmrtnost na choroby srdce a cév a pravděpodobně i na rakovinu plic, atd.). Znečištění prachem má za následek pravděpodobně i vznik respiračních alergií (v ČR zhruba 15% dětí). Prachové částice se rozdělují na hrubé a jemné.

Hrubé prachové částice :

PM₁₀ – prašný aerosol o střední hodnotě aerodynamického průměru menším než 10 µm. Tvoří 55-95% celkové prašnosti v závislosti na typu znečištění v dané oblasti. Jeho životnost je několik minut až hodin.

Jemné prachové částice:

PM_{2,5} – prašný aerosol o střední hodnotě aerodynamického průměru menším než 2,5 µm. Tento typ aerosolu je nazývaný respirabilní frakce a proniká až do plicních sklípků. Jde o nejvíce zastoupenou frakci v ovzduší (až 90%) (Sugita et al., 2004). Aerosolové částice PM_{2,5} jsou významné vzhledem ke své malé velikosti a relativně velkému povrchu, na

který se zachytávají další látky, které mohou být zdraví škodlivé. Vznikají spalováním fosilních paliv. Jejich přítomnost vyvolává imunitní reakce organismu doprovázené tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou vést k oxidačnímu stresu. Jejich povrch obsahuje polycyklické aromatické uhlovodíky, kondenzované organické nebo kovové páry, z nichž některé mají mutagenní a rakovinotvorný účinek. Jejich životnost je několik dnů až týdnů.

Nanočástice:

Nanočástice obsažené ve vzduchu jsou definovány jako částice s průměrem menším než 100 nm. I přes malý příspěvek k celkové hmotnosti aerogenních částic se jim věnuje stále větší pozornost. Zatím máme k dispozici jen omezené toxikologické informace o nanočásticích. Je známo, že rychlost depozice nanočástic v dýchacím traktu je relativně vysoká. Dieslem poháněná vozidla jsou hlavními zdroji nanočástic v městském prostředí (Fujitani Y, Hirano S, 2008).

Výzkum respirabilních částic se zaměřil na roli nanočástic při navození oxidačního stresu, který vede k zánětu a zhoršení již existujících dýchacích a kardiovaskulárních onemocnění. Epidemiologické studie opakovaně našly pozitivní korelaci mezi úrovní znečištění ovzduší částicemi a zvýšenou nemocností a úmrtností u dospělých i dětí. Tyto studie také zjistily souvislost mezi nemocemi dýchacích cest a množstvím ultrajemných částic v prostředí. Nanočástice generují ROS ve větší míře než větší částice (Stone et al., 2007).

Nanočástice se dostávají až do plicních sklípků, odkud jsou odstraňovány fagocytózou. V plicích hraje významnou roli aglomerace nanočástic do větších útvarů, ty totiž obtížněji pronikají do jiných tkání. Nanočástice také mohou aktivovat makrofágy k sekreci enzymů způsobujících záněty. Byly provedeny experimenty průchodnosti inhalovaných nanočástic do tělního oběhu na zdravých lidských dobrovolnících. Ti inhalovali uhlíkové nanočástice s rozměrem 5-100 nm, které byly označené izotopem ^{99m}Tc . Nanočástice se poměrně rychle rozšířily do jater a jiných částí těla (Nemmar et al., 2002). V práci Limbach et al. (2007) byl studován nitrobuněčný oxidační proces in vitro. Po expozici lidských plicních epiteliálních buněk Fe-, Co-, Mn- a Ti- křemenným nanočásticím bylo zjištěno, že nanočástice vyvolávaly 8 krát větší oxidační stres (Co, Mn), než když byla identická tkáň exponována vodnému roztoku stejných kovů.

Nanočástice také pronikají vnější membránou mitochondrií a tím spustí předčasnou naprogramovanou buněčnou smrt (Salnikov et al., 2007).

3.2. Volatilní organické látky (VOC - volatile organic compounds)

Mnohé z VOC vykazují akutní a chronickou toxicitu u lidí. Vyskytují se v hromadně využívaných produktech, jako jsou rozpouštědla, paliva, barvy, nátěrové hmoty, čisticí a kosmetické přípravky atd. Do organismu mohou vstoupit ve formě plynné, tekuté, nebo jako aerosol. Způsobují otoky, zvýšené prokrvení kůže, infiltraci leukocytů a nekrózu v místě expozice a zvýšení hladiny ROS. Rozhodujícím zdrojem atmosférických emisí VOC ve městech je automobilová doprava (Crebelli et al., 2001). Proto se studie zabývající se znečištěným ovzduším zaměřují na aromatické uhlovodíky, které jsou součástí výfukových plynů a jsou toxické. Další zdroje těchto emisí jsou ztráty vypařováním při manipulaci, skladování a distribuci benzinů. Emise z mobilních zdrojů představují asi 85% celkových emisí aromatických uhlovodíků s převládající částí emisí z výfukových plynů. Je odhadováno, že zbylých 15% emisí pochází ze stacionárních zdrojů (procesy produkující aromatické uhlovodíky a procesy používající tyto sloučeniny k výrobě dalších chemikálií) (Adamec, 2004). Nejvýznamnější VOC je benzen, který Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila do skupiny 1 jako prokázaný lidský karcinogen. Je přítomný především v emisích z dopravy, cigaretovém kouři a výrobcích chemického průmyslu. Expozice tomuto karcinogenu má za následek zvýšení rizika akutní myeloidní leukemie (Scherer, 2005). Etylbenzen byl zařazen do skupiny 2B, toluen a xyleny do skupiny 3 (IARC, 2011).

3.3. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

Základní charakteristikou polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU, z angl. PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons) je, že ve svých molekulách obsahují dvě a více kondenzovaných aromatických jader. Jádra jsou uspořádána lineárně, angulárně nebo klastrově (obr. 1) a mohou být různě substituována. Nejčastějšími substituenty jsou halogen-, amino-, sulfo- a nitroderiváty. Nejstabilnější jsou jádra uspořádána angulárně, nejméně stabilní je lineární uspořádání. PAU jsou cyklické sloučeniny s rovinným cyklem, v jehož struktuře se střídají jednoduché a dvojné vazby, navzájem převeditelné posunem elektronů (π). Čisté sloučeniny jsou za normální teploty bílé nebo nažloutlé krystalické pevné látky. Jsou velmi málo rozpustné ve vodě, ale snadno se rozpouštějí v organických rozpouštědlech, tucích a olejích.

Do skupiny PAU patří na 10 tisíc různých chemických sloučenin. Nejznámější jsou např. následující látky: naftalen, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, benz[a]antracen (B[a]A), benzo[a]pyren (B[a]P), benzo[b]fluoranten (B[b]Flu), benzo[ghi]perylene (B[ghi]P), benzo[k]fluoranten (B[k]Flu), dibenz[ah]antracen (D[ah]A), chrysen (Chry), ideno[1,2,3-cd]pyren (I[cd]P) (obr. 2).

Polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty jsou všeobecně rozšířenými polutanty v našem životním prostředí. Mohou být metabolizovány na příslušné diol-epoxydy, které se vyznačují mutagenními a karcinogenními účinky (IARC, 1983; White, 2002; Mersch-Sundermann et al., 1992). Na prachové částice v ovzduší je navázána extrahovatelná organická hmota (EOM), která se skládá z velkého množství sloučenin (Lewtas, 1992). Tyto komplexní směsi můžeme rozdělit na tři základní frakce: bazickou, kyselou a neutrální. Neutrální frakci, která nejvíce odpovídá za celkovou toxicitu extraktu, můžeme rozdělit na několik subfrakcí, a to slabě polární, středně polární, vysoce polární, alifatickou a aromatickou, která obsahuje hlavně PAU a jejich deriváty (Leníček et al., 1998).

Jak již bylo zmíněno výše, jednou z nejdůležitějších komponent komplexních směsí znečištěného ovzduší jsou karcinogenní PAU. Tyto sloučeniny vznikají během různých spalovacích procesů (nedokonalé spalování materiálů obsahujících uhlík), koksárenství, hutnictví, zplyňování a zkapalňování uhlí, výroby hliníku. Lokální topeniště jsou majoritním emisním zdrojem PAU v zimních obdobích, zatímco automobilová doprava je hlavním emisním zdrojem PAU v letních obdobích (Binková et al., 2003). Ve vnitřních prostorech je nejvýznamnějším zdrojem PAU cigaretový kouř (Lewtas et al., 1992).

Bylo prokázáno, že k-PAU tvoří po metabolické aktivaci pomocí enzymů cytochromu P450 DNA adukty (Hemminki et al., 1994; Dipple, 1995; Khalili et al., 2000), nebo produkty metabolické aktivace k-PAU mohou být katalyzovány dihydrodiol dehydrogenásou na PAU o-chinony. Tyto molekuly vstupují do redoxních cyklů a dávají vznik reaktivním formám kyslíku, které způsobují oxidační poškození DNA a jiných makromolekul (Park et al., 2006; Burczynski and Penning, 2000).

Stále důležitější otázkou se stává stanovení obsahu PAU v potravinách. Hladina kontaminace potravin PAU sice nedosahuje vysokých hodnot, ale vzhledem k biologické aktivitě a trvalému působení je populace vystavena určitému riziku spojenému s karcinogenní a mutagenní aktivitou těchto látek. Endogenní tvorba PAU při tepelné úpravě potravin je za běžných podmínek zanedbatelná, pouze v extrémních případech např.

přepálením tuku (teplota okolo 500°C) dochází k tvorbě PAU. Exogenní znečištění, kdy potraviny přicházejí do styku se zplodinami hoření při grilování, pražení, uzení, je mnohem významnější. Do skupiny potravin obsahující relativně vyšší hladiny PAU můžeme tedy zahrnout uzené, grilované maso, ryby, listovou zeleninu, olejnatá semena a tuky a oleje z nich vyrobené. Např. cereálie sice neobsahují vysoké hladiny PAU, ale vzhledem k jejich relativně vysokému zastoupení v potravním koši tak představují jeden z jejich nejvýznamnějších zdrojů (Tomaniová et al., 1997; Phillips, 1999).

Polycyklické aromatické uhlovodíky vykazují kromě již zmíněné genotoxické, embryotoxické (Topinka et al., 2000; Binková et al., 1998a; Binková et al., 1999 a další) a karcinogenní (Lewtas et al., 1992) aktivity i další negativní účinky (např. inhibici mezibuněčné komunikace) (Bláha et al., 2002). V ovzduší se tyto látky váží na prachové aerosolové částice ($< 2,5 \mu\text{m}$). Epidemiologické studie prokázaly, že dlouhodobé vystavení těmto částicím může být příčinou zvýšené nemocnosti i úmrtnosti na respirační a kardiovaskulární onemocnění (Dockery et al., 1993; Samet et al., 2000; Pope et al., 2002).

Ve studii Dejmek et al. (1999) byl prokázán vztah mezi expozicí aerosolovým částicím PM_{10} a $\text{PM}_{2,5}$ během prvního měsíce těhotenství a zvýšeným rizikem nitroděložní růstové retardace plodu (IUGR), která je pravděpodobně způsobena přítomností karcinogenních PAU navázaných na tyto částice. Další studie prokázala, že se stoupající expozicí PAU se zvyšují hladiny DNA aduktů v placentě. Právě v placentách plodů postižených růstovou retardací byly nalezeny nejvyšší hladiny DNA aduktů (Šrám et al., 1999). Ve stejné studii byl zkoumán i vliv znečištěného ovzduší na kvalitu lidských spermií. V období vysokého znečištění ovzduší byla prokázána zvýšená fragmentace DNA a zvýšená aneuploidie spermií. Proto zvýšená expozice karcinogenním PAU může mít za následek i neplodnost u člověka, zejména pak u jedinců s nepříznivým genotypem.

Pro hodnocení rizika u člověka je klasické monitorování PAU v životním prostředí málo významné, protože vyžaduje přihlédnutí k individuálním rozdílům ať už determinované geneticky nebo získané v souvislosti s životním stylem nebo dalšími faktory prostředí. Vhodnou alternativou se proto stává biomonitoring sledující dané biomarkery expozice. Biomarkery jsou měřitelné biochemické, cytogenetické, imunologické nebo molekulární parametry, které přímo či nepřímo závisí na aktuální nebo dlouhodobé expozici organismu (Binková, 1993). Použití biomarkerů je výhodné hlavně v populačních studiích, protože jejich sledováním můžeme získat informace o poškození genetického materiálu (DNA) ještě desetiletí před tím, než jsou patrné první klinické

změny. Proto jsou biomarkery využívány i v preventivním lékařství jako indikátory změn, které mohou při dlouhodobém působení negativně ovlivnit zdravotní stav populace.

Za genotoxické látky se označují chemické látky, které poškozují genetický materiál modifikací DNA např. deaminací, oxidací, tvorbou DNA aduktů, ztrátou bazí, jedno a víceřetězcovými zlomy nebo tvorbou pyrimidinových dimerů.

DNA adukty jsou vhodné biomarkery expozice, protože odrážejí biologicky aktivní dávku. Tyto adukty mohou v organismu přetrvávat různě dlouhou dobu, od několika dnů po měsíce. Tato doba závisí na intenzitě reparace DNA, odstranění poškozených buněk apoptózou, nebo nekrózou. Individuální rozdíly v hladinách DNA aduktů mohou být také podmíněny geneticky nebo enzymovou aktivitou v průběhu života jedince (Binková, 1993).

3.4. DNA adukty

Stále častěji jsou lidé vystaveni působení různých xenobiotik (cizorodých látek), např. léků, potravinových přísad, znečišťujících látek, apod., která musí být nejdříve metabolizována a teprve poté mohou být vyloučena z těla. V lidském těle se na metabolismu xenobiotik podílejí játra. Někdy mohou být xenobiotika vyloučena v nezměněné podobě. Katalytické reakce metabolismu xenobiotik se účastní na 30 enzymů a probíhá ve dvou fázích. V první fázi je hlavní reakcí hydroxylace, katalyzovaná enzymy ze třídy monooxygenáz, neboli systému cytochromu P450. Kromě toho tyto enzymy katalyzují širokou škálu reakcí včetně deaminace, dehalogenace, desulfatace, epoxidace, peroxidace a redukce. Jednotlivé typy cytochromu P450 se vyskytují i jako polymorfní formy, z nichž některé mají nízkou katalytickou aktivitu. V druhé fázi jsou sloučeniny vytvořené v první fázi převedeny prostřednictvím specifických enzymů na různé polární metabolity konjugací s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem, glutathionem, nebo některou z aminokyselin, nebo pomocí metylace. Konjugací se tedy zvýší rozpustnost sloučenin ve vodě a tím mohou být vyloučeny z těla močí nebo žlučí. Konjugace s glutathionem (γ -glutamyl-cysteinylglycin) katalyzují enzymy zvané glutathion-S-transferázy, které jsou přítomné ve velkém množství v jaterním cytosolu a v nižších hladinách i v jiných tkáních (plíce, placenta, atd.). Pokud by potenciálně toxická xenobiotika nebyla konjugována s glutathionem, mohla by se kovalentně vázat s DNA, RNA nebo proteiny, a to by mohlo vést k vážnému poškození buněk. Další důležitou

reakcí je konjugace s acetátem, která je katalyzovaná acetyltransferázami přítomnými v různých tkáních, především ale v játrech. Polymorfní typy acetyltransferáz se rozdělují na pomalé nebo rychlé acetylátory. N-acetyl transferáza může inaktivovat některé látky, které tlumí reparace nukleové kyseliny. Proto pomalí inaktivátoři (acetylátoři) jsou méně chráněni před vznikem somatických mutací.

Mnoho chemických látek se stává genotoxickými až po metabolické aktivaci. Např. benzo[a]pyren vyžaduje aktivaci monooxygenázami v endoplazmatickém retikulu, aby se stal karcinogenním. Epoxid hydrolázy jsou zajímavé, protože mohou mít ochranný účinek proti některým karcinogenům. Jeden druh cytochromu P450 – hydroxyláza aromatických uhlovodíků (arylhydrokarbon hydroxyláza, AHH), aktivuje polycyklické aromatické látky na epoxidy v makrofázích. Epoxidy jsou vysoce reaktivní a mutagenní, nebo karcinogenní, nebo obojího charakteru. Epoxid hydroláza působí na tyto sloučeniny a přeměňuje je na méně reaktivní dihydrodioly. AHH se vyskytuje ve dvou alelách, které jsou navzájem kodominantní, *a* a *b*, z nichž *a* je méně aktivní. Lidé s genotypem *bb* jsou proto více ohroženi vznikem rakoviny. V jiných případech může hydroxylace přeměnit biologicky aktivní látky na méně aktivní, nebo je inaktivovat ještě předtím, než dojde ke konjugaci. U dalších sloučenin může dojít ke snížení biologické aktivity během konjugace; v několika případech může konjugace naopak zvýšit biologickou aktivitu xenobiotik (Murray et al., 2003).

Expozice chemickým karcinogenům vede ke vzniku elektrofilních meziproductů interagujících s DNA za vzniku kovalentní vazby karcinogenu na DNA – tzv. DNA adukt (Holoubek, 1996). DNA adukty se nejčastěji váží na guaninovou bázi DNA. PAU a aromatické aminy reagují s uhlíkem C₈ a dusíkem N₂, alkylační činidla se naváží na dusík v poloze 7. Nejsou-li adukty odstraněny reparačními systémy buňky před replikací DNA, dojde k vytvoření mutace (záměny nukleotidů), delece, nebo amplifikace úseků DNA. Změny genetického materiálu mohou také aktivovat protoonkogeny a inaktivovat tumor-supresorové geny. Proto se buňka může transformovat v buňku maligní a dále dát vznik bujení nádoru. Přítomnost DNA aduktů je tedy považována za prvotní krok v procesu karcinogeneze (Harris, 1991; Nesnow et al., 1998b).

Nejpoužívanějšími metodami detekce a kvantifikace DNA aduktů jsou ³²P-postlabeling a imunochemická analýza, využívané jak v biomonitoringu, tak při studiu vzniku aduktů DNA in vitro a in vivo na pokusných zvířatech. ³²P-postlabeling byl poprvé popsán Randerathem et al., 1981 a Guptou et al., 1982, později byl různě modifikován.

Tato metoda je nejrozšířenější v detekci aduktů díky svým vlastnostem. Je velmi citlivá, umožňuje detekci 1 aduktu na $10^9 - 10^{10}$ nukleotidů, k jejímu provedení stačí velmi malé množství DNA (1-10 µg). Pomocí této metody můžeme detekovat adukty s různým chemickým složením i neznámé adukty odvozené od komplexních směsí látek.

Imunochemické metody jsou založené na specifické interakci antigenu a protilátky. Nevýhoda těchto metod je nutnost vyvinout specifické protilátky pro každý typ studovaného aduktu. Tyto metody ale na druhou stranu lze provést snadno a rychle a mohou dosáhnout citlivosti až 1 aduktu/ 10^8 nukleotidů. Imunochemické metody mohou v biomonitoringu sloužit jako screening DNA aduktů (Binková, 1993).

Biomonitoring aduktů u lidí se zaměřuje hlavně na detekci aduktů polycyklických aromatických uhlovodíků. Prokázalo se, že řada PAU byla karcinogenní u pokusných zvířat, některé z nich i u člověka (IARC, 1984; IARC, 1987). Velká část populace je vystavena nižším dávkám PAU, pocházejícím z automobilové dopravy, cigaretového kouře nebo ze spalování fosilních paliv, naopak některé skupiny obyvatelstva jsou vystaveny vyšším dávkám PAU – jsou to lidé pracující v ocelárnách, koksárenském průmyslu a další. (Binková, 1993).

Rostoucí využívání ^{32}P -postlabeling testu pro detekci nebo identifikaci DNA aduktů u zvířat a lidí, kteří jsou vystaveni chemikáliím, lze přičíst jeho extrémně vysoké citlivosti. Tato metoda může být používána v prospektivních studiích zaměřených na posouzení rizika pro člověka vystaveného průmyslově znečišťujícím látkám, látkám znečišťujícím životní prostředí, potravinovým kontaminantům, lékům. Konečně by aplikace této metody mohla vést k dosažení zlepšení v oblasti epidemiologie nádorů a v prevenci rakoviny (Stiborová et al., 1998).

3.4.1. PAU a vznik DNA aduktů

3.4.1.1. PAU-DNA adukty in vitro

In vitro modely představují relativně jednoduchý způsob, jak studovat mechanismus působení celé řady genotoxických látek.

Ve studii Topinka et al. (2008) byla použita jaterní buněčná linie potkana WB-F344, která je založena na in vitro modelu tzv. oválných buněk, ke zjištění genotoxických účinků vybraných karcinogenních PAU. S výjimkou dibenzo[a,l]pyrenu, a částečně i

benzo[g]chrysenu a benzo[a]antracenu, všechny ostatní PAU indukovaly vysokou úroveň exprese CYP1A1 a CYP1B1 mRNA. Autoři zaznamenali zřetelný genotoxický a cytotoxický účinek dibenzo[a,l]pyrenu, a v menší míře i benzo[a]pyrenu; benzo[g]chrysen a dibenzo[a,e]pyren tvořily vysoké hladiny DNA aduktů. Autoři dále zkoumali účinky 2,4,3', 5'-tetramethoxystilbenu a fluorantenu, inhibitorů CYP1B1, enzymu, který hraje ústřední roli v metabolické aktivaci dibenzo[a,l]pyrenu. Obě sloučeniny inhibovaly apoptózu vyvolanou dibenzo[a,l]pyrenem. Současná data ukazují, že v modelových buněčných liniích, které sdílejí fenotypové vlastnosti s oválnými buňkami, mohou být PAU efektivně metabolizovány na konečné genotoxické metabolity. Buněčná linie WB-F344 se ukázala být vhodným modelovým systémem pro studium genotoxických účinků organických kontaminant v jaterních buňkách.

Autoři Sevastyanova et al. (2007) použili lidské buňky hepatomu HepG2, diploidní lidské fibroblasty HEL a lidské buňky monocytární leukémie THP-1. DNA adukty byly analyzovány metodou ^{32}P -postlabeling. Celková úroveň DNA aduktů indukovaných v buňkách HepG2 po expozici EOM byla větší než v buňkách HEL kultivovaných za stejných podmínek (15–190 versus 2–15 aduktů/ 10^8 nukleotidů, v HepG2 a HEL buňkách). THP-1 buňky vykazovaly nejnižší úroveň DNA aduktů po expozici EOM (1,5–3,7 aduktů/ 10^8 nukleotidů). Přímá korelace mezi celkovou úrovní DNA aduktů a karcinogenními PAU v EOM byla nalezena v buňkách HepG2 inkubovaných s 50 μg EOM/ml ($R = 0,88$; $p = 0,0192$). Tato korelace byla dokonce silnější, když byly analyzovány spoty odpovídající polohou expozici benzo[a]pyrenu ($R = 0,90$; $p = 0,016$). Buňky THP-1 mají omezenou metabolickou aktivitu pro většinu karcinogenních PAU a jsou také více náchylné k toxickým účinkům PAU a EOM. Proto se tato buněčná linie ukázala být nevhodnou pro studium genotoxicity PAU. Výsledky ukázaly, že většina DNA aduktů detekovaná v buňkách inkubovaných s EOM má svůj původ v nízkých koncentracích karcinogenních PAU představujících 0,03 až 0,17% z celkové hmotnosti EOM. Buňky HepG2 mají metabolickou kapacitu pro PAU podobnou lidským hepatocytům a představují tedy ze všech tří testovaných buněčných linií nejlepší model pro vyšetřování genotoxického potenciálu komplexních směsí obsahujících PAU.

Binková a Šrám (2004) ve své studii použili lidské diploidní plicní fibroblasty (HEL) a sledovali genotoxický účinek několika karcinogenních PAU. Byl testován dibenzo[a,l]pyren, benzo[a]pyren, benz[a]anthracen, benzo[b]fluoranthén, benzo[g,h,i]perylen, chrysen, dibenz[a,h]anthracen a indeno[c,d]pyren. DNA adukty byly stanoveny

pomocí ^{32}P -postlabelingu. Výsledky ukázaly, že potence navázání karcinogenních PAU na DNA byla následující: $\text{DB[a]P} \gg \text{B[a]P} \gg \text{B[b]Flu} \sim \text{Chry} \sim \text{B[k]Flu} \sim \text{B[a]A} \sim \text{D[ah]A} \sim \text{I[cd]P} > \text{B[ghi]P}$. DB[a]P a B[a]P byly vybrány k posouzení genotoxického účinku. Hladina DNA aduktů byla vyhodnocena 4-6 dní po 24 hod. expozici. Po této době nebylo pozorováno snížení hladiny DNA aduktů. Proto se předpokládá, že tyto karcinogenní PAU jsou aktivovány enzymy syntetizovanými až v pozdějším období po expozici. Nezměněné karcinogenní PAU tedy působí jako rezervoár uvnitř buněk pro dlouhodobou výrobu aktivních metabolitů. Lidské diploidní plicní fibroblasty vykazují nižší metabolickou kapacitu než jiné cílové lidské buňky. Proto může být jednodušší kompetitivně inhibovat metabolické enzymy v tomto buněčném systému. Toto zjištění by také mohlo vysvětlit obecně nízké hladiny PAU-DNA aduktů detekované v lidských studiích za použití lymfocytů, které mají také nízkou metabolickou kapacitu.

Autoři Binková et al. (2007) zkoumali genotoxicitu směsí PAU a organického extraktu získaného z částic ovzduší tří evropských měst – Praha, Sofie, Košice. Byl použit acelulární test calf thymus DNA s S9 nebo bez S9 mikrozomální frakce za využití metody ^{32}P -postlabeling k měření genotoxicity organických látek navázaných na částice PM_{10} v letním a zimním období. Samotný B[a]P indukoval hladiny DNA aduktů v rozmezí 4,8-768 aduktů/ 10^8 nukleotidů. Nicméně směs 8 karcinogenních PAU, s ekvimolárním množstvím B[a]P, indukovala 3,7-757 aduktů/ 10^8 nukleotidů, což naznačuje inhibici tvorby DNA aduktů během interakce jednotlivých PAU mezi sebou. Hladiny DNA aduktů vykazovaly vyšší variabilitu během odběrových období než mezi lokalitami. Hladiny DNA aduktů pro pražské vzorky se pohybovaly v rozmezí 19-166 aduktů/ 10^8 nukleotidů, pro Košice 22-85 a pro Sofii 6-144 aduktů/ 10^8 nukleotidů. Bioaktivace s S9 mikrozomální frakcí vyvolala 2 až 7 násobné zvýšení hladin DNA aduktů ve srovnání se vzorky bez S9 frakce (-S9). To naznačuje zásadní úlohu nepřímo působících genotoxických komponent, jako jsou PAU. Poprvé byla také zjištěna významná pozitivní korelace mezi obsahem B[a]P v EOM a celkovými hladinami aduktů DNA zjištěných v EOM vzorcích ($R = 0,83$; $p = 0,04$). Tyto výsledky naznačily, že obsah B[a]P v EOM je důležitý faktor pro celkový genotoxický potenciál EOM a že B[a]P je tím pádem dobrý ukazatel přítomnosti genotoxických sloučenin způsobující vytváření DNA aduktů.

3.4.1.2. PAU-DNA adukty in vivo

Zkoumání tvorby DNA aduktů in vivo je časově i technicky náročnější, než studie in vitro. Z hlediska hodnocení rizika karcinogenity chemických látek je ale mnohem významnější.

Autoři Leavitt et al. (2008) ve své studii sledovali vliv dvou dávkovacích režimů na mutagenitu DB[a,l]P a B[a]P in vivo pomocí Big Blue transgenního myšního systému. Porovnávali podání jednotné vysoce karcinogenní dávky jednotlivých PAU s frakcionovaným podáním stejné dávky podávané po dobu 5 dnů s očekáváním, že PAU indukující mutace budou vyšší u zvířat, která dostávala vysokou jednotnou dávku než u zvířat, která dostávala frakcionovanou dávku. Působením DB[a,l]P se 2,5 krát zvýšila četnost mutantů oproti kontrole u jednotné dávky a 3 krát u frakcionované dávky. Oba dávkovací režimy s B[a]P (jednotná i frakcionovaná dávka) produkovaly asi 15 násobné zvýšení četnosti mutací ve srovnání s kontrolami. Mutace indukované B[a]P a DB[a,l]P korelovaly se stabilními kovalentními DNA adukty vytvořenými těmito látkami. Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějším zjištěním, že kovalentní stabilní DNA adukty tvořené těmito dvěma PAU způsobují promutagenní poškození, což přispívá k PAU-indukované mutagenezi v plicích myši in vivo.

Autoři Whong et al. (1994) zkoumali ve své studii tvorbu DNA aduktů in vivo pomocí těchto chemických látek: benz[a]anthracen, (B[a]A), dibenz[a,h]anthracen (DB[ah]A), dibenzo[a,l]pyren (DB[al]P) a dibenz[a,h]acridin (DB[ah]AC). Analýzu provedli v systému plicních buněk potkana za použití ³²P-postlabelingu. Šesti skupinám potkanů (samci) byly 3 krát podávány dávky B[a]A, DB[ah]A, DB[al]P v 24 hod. intervalu. Plicní buňky byly enzymaticky separovány a použity ke stanovení hladin aduktů DNA. Výsledky ukázaly, že všechny 4 testované sloučeniny vytvářely adukty DNA in vivo a genotoxická aktivita DNA aduktů zjištěných postlabelingem byla detekována již při nejnižších hladinách podávané dávky.

Autoři Mahadevan et al. (2005) zjistili, že systémová expozice dibenzo[a,l]pyrenu způsobuje poškození DNA v plicní tkáni myši. C57BL/6 myši byly uměle vyživovány sondou s 1, 5 nebo 20 mg dibenzo[a,l]pyrenu na kg váhy těla, denně po dobu 10 dnů. Toxicita DB[al]P se projevila poklesem tělesné hmotnosti a orgánů myši. Plíce byly poté vyjmuty z těl zvířat a podrobeny analýze DNA aduktů. Byla odhalena závislost aduktů na dávce v plicní tkáni. Většina DNA aduktů v plicích myši byla vytvořena po systémové

expozici DB[al]P. Data z tohoto in vivo modelu jsou shodná s předešlými výsledky metabolické aktivace DB[al]P získanými z lidských buněčných kultur.

Autoři Wolterbeek et al. (1993) použili buňky tracheálního epitelu křečka ke sledování vlivu benzo[a]pyrenu na vznik DNA aduktů. Adukty B[a]P-DNA byly tvořeny v kultuře in vitro a byly srovnány s adukty tvořenými in vivo po intratracheální intubaci křečka B[a]P. Metodou ^{32}P -postlabeling byl detekován pouze jeden DNA adukt in vivo a čtyři B[a]P-DNA adukty in vitro. Tvorba B[a]P-DNA aduktů závisela jak na čase, tak na použité dávce. Hlavní DNA adukt vytvořený in vitro migroval do stejné pozice na tenkovrstevném chromatogramu jako adukt vytvořený in vivo.

3.4.2. Vliv expozice komplexním směsím PAU z ovzduší na tvorbu DNA aduktů

Výhodou metody ^{32}P -postlabelingu ke stanovení DNA aduktů je možnost jejího využití k analýze působení komplexních směsí, které jsou přítomny v ovzduší. Pozornost se soustředí hlavně na oblasti s vyšším znečištěním ovzduší a na vliv znečištěného ovzduší na zdraví dané populace.

V roce 1993 se začala monitorovat kvalita ovzduší v silně znečištěných oblastech České republiky, konkrétně v severních Čechách. První rozsáhlá studie, která se tomuto tématu věnovala, byla nazvána Program Teplice. Byl studován vliv znečištění ovzduší na zdraví obyvatel v okrese Teplice a v kontrolní oblasti Prachaticka. Byla použita metoda frakcionace vzorků k vyšetření biologické aktivity u různých chemických látek v ovzduší. Charakteristika jednotlivých látek znečišťujících ovzduší prokázala neobvykle vysokou koncentraci jemných částic během zimních inverzí. Dominovaly kyselé sírany, genotoxické organické sloučeniny a toxické stopové prvky. Studie vlivu na člověka a biomarkery prokázaly velké sezónní výkyvy ve znečištění ovzduší v rámci okresu Teplice a vyšší sezónní průměr znečištění než ve srovnávacím okrese Prachatice. Expozice jemným prachovým částicím a organickým karcinogenům (např. PAU) byly korelovány s vylučováním metabolitů PAU v moči, několika stopových kovů v krvi a DNA adukty nalezenými v bílých krvinkách. Dále byly provedeny respirační a neurobehaviorální studie na školních dětech pomocí dotazníků a klinických měření. Významně vyšší výskyt nežádoucích respiračních příznaků a snížení funkce plic byly zjištěny v okrese Teplice než v Prachaticích. Dále byly provedeny reprodukční studie na mužích i ženách. Studie účinků expozice na těhotenství a porod odhalila výskyt nízké porodní váhy a předčasných porodů

v Teplicích. Tyto nežádoucí účinky byly častější u dětí počatých v zimě a u dětí, jejichž matky byly kuřačky. Měření kvality semene u mužů prokázalo, že expozice vysoké úrovni znečištěného ovzduší je spojena s přechodným poklesem jeho kvality (Šrám et al., 1996).

V práci Binková et al. (1998b) byla sledována genotoxická aktivita komplexních směsí látek navázaných na respirabilní prachové částice a jejich jednotlivé frakce v okrese Teplice a Prachatice během zimních a letních období. K tomuto účelu byla použita calf thymus DNA (CT-DNA), která byla inkubována se vzorky EOM i vzorky jednotlivých frakcí za redukčních a oxidačních podmínek. Inkubace za aerobních podmínek probíhala bez a s metabolickou aktivací s použitím S9 mikrozomální frakce. DNA adukty vytvořené bez účasti metabolické aktivace (-S9) ukazují na látky reagující s DNA přímo, zatímco při použití metabolické aktivace (+S9) se tvoří DNA adukty vlivem látek vyžadujících metabolickou aktivaci. Výsledky potvrdily, že mezi zimním a letním obdobím jsou výraznější rozdíly než mezi lokalitami. Biologická aktivita vzorků EOM z obou lokalit byla v zimním období signifikantně vyšší než v letním období. Množství celkové organické hmoty navázané na aerosolové prachové částice bylo v zimním období 2 krát a v letním období 1,5 krát vyšší v Teplicích než v Prachaticích. Nejvyšší biologickou aktivitu vzorků EOM pak vykazovala aromatická frakce, bez závislosti na okresu nebo sezóně. Prokázalo se, že spektra hlavních aduktů odvozených od jednotlivých frakcí i celkových extraktů jsou podobná. Tvorba tzv. hlavních DNA aduktů nezávisela na lokalitě ani sezóně odebraných EOM vzorků a tyto adukty byly tvořeny stejnými typy chemických látek. Aromatické frakce tvořily asi 8% celkové EOM v zimním a asi 3% EOM v letním období v obou lokalitách. Za podmínek s metabolickou aktivací byly zjištěny DNA adukty tvořené reaktivními metabolity: B[a]P, B[b]F, B[j]F, B[k]F, chrysenem, B[a]A a I[cd]P. DNA adukty odvozené od těchto látek tvořily asi 60% celkových DNA aduktů vytvořených těmito frakcemi. Výsledky studie poukázaly na fakt, že pro testování genotoxicity komplexních směsí je méně vhodné použití frakcionačního postupu, neboť jednotlivé složky směsi mohou podléhat vzájemné interakci.

Studie Topinky et al. (1998; 2000) prokázaly, že k hodnocení genotoxicity komplexních směsí (např. extraktů částic ovzduší nebo extrakty emisí z koksáren) je vhodnější studovat biologickou aktivitu těchto směsí (schopnost vytváření DNA aduktů) než využití pouze chemické analýzy.

Ve studii autorů Topinka et al. (2000) byl sledován genotoxický účinek EOM získané z ovzduší lokalit Teplice a Prachatice v průběhu letního a zimního období na

buněčnou kulturu primárních hepatocytů potkana (schopné metabolizování xenobiotik včetně PAU) a geneticky modifikované linie plicních buněk čínského křečka V79NH (chybí jí enzymy skupiny cytochromu P450, ale je schopna specificky aktivovat nitrované PAU nitroreduktázami a N-acetyltransferázami). Po expozici hepatocytů EOM bylo zjištěno, že nejvyšší genotoxickou aktivitu vykazují látky obsažené v aromatické a slabě polární frakci, které obsahují hlavně PAU a nitro-PAU. Tyto dvě frakce dosahovaly 75-90% celkově vytvořených DNA aduktů ve všech frakcích, nezávisle na lokalitě a období sběru vzorků z ovzduší. Množství DNA aduktů bylo v zimním období 3-4 krát vyšší než v letním období. Po přepočtu koncentrace extrahovatelné organické hmoty na m^3 (EOM/m^3) byl rozdíl mezi zimním a letním obdobím 10 krát vyšší. Vzorky z průmyslových oblastí Teplicka indukovaly hladiny DNA aduktů asi 2 krát vyšší než vzorky z Prachatic. Na rozdíl od hepatocytů se v buňkách V79NH našlo až 80% DNA aduktů indukovaných EOM odvozených od slabě polární frakce. Sezónní rozdíly byly podobné jako u hepatocytů větší než rozdíly mezi lokalitami. Výsledky prokázaly, že jak PAU, tak nitro-PAU jsou hlavními zdroji genotoxicity ovzduší v oblasti Teplice i Prachatic.

Autoři Topinka et al. (1997) studovali tvorbu DNA aduktů v placentách matek vytvořených vlivem znečištěného ovzduší, aktivního kouření a modulovaných metabolickými genotypy GSTM1 (polymorfismus genu kódujícího glutathion S-transferázu M1, což je enzym podílející se na detoxikaci PAU v organismu) a NAT2 (polymorfismus genu kódujícího N-acetyl transferázu 2 – enzym podílející se na metabolické aktivaci PAU). Do studie bylo zahrnuto 158 matek (113 nekuřáček a 45 kuřáček) žijících v regionu Teplice jako znečištěné průmyslové oblasti a Prachatice jako oblasti bez těžkého průmyslu.

V obou regionech byly analyzovány vzorky placent matek, které porodily živé dítě v letním období (červen–září) a v zimním období (listopad–únor). Jednotlivá spektra DNA aduktů byla pro oba regiony stejná, lišily se pouze jejich hladiny. Zvýšené hladiny DNA aduktů byly zjištěny v placentách matek žijících v regionu Teplice ve srovnání s regionem Prachatice. Z hlediska doby porodu byl tento rozdíl výraznější v zimním než v letním období. Naopak žádný významný rozdíl nebyl nalezen ve skupině kuřáček, když se vzaly v úvahu rozdíly v hladinách DNA aduktů v obou sledovaných regionech zvlášť pro kuřáčky a nekuřáčky. Ve skupině nekuřáček byly zjištěny vyšší hladiny DNA aduktů v placentách matek z regionu Teplice. Nezávisle na lokalitě měly matky kuřáčky (10 a více cigaret

denně) nejvyšší výskyt DNA aduktů v placentě. Vyšší hladiny DNA aduktů v placentách matek byly zjištěny ve skupině s GSTM1-negativním genotypem v porovnání s GSTM1-pozitivním genotypem. Tento nálezn byl výraznější v regionu Teplice než v Prachaticích a pro nekuřačky více než pro kuřačky. To také podporuje hypotézu, že úloha metabolických genotypů je významná již při nízkých expozicích. Hladiny DNA aduktů nalezené v placentách matek s GSTM1-negativním genotypem byly vyšší u matek žijících ve znečištěném regionu Teplice než v Prachaticích. U GSTM1-negativní populace byla hladina DNA aduktů v placentách vyšší v letním období než v zimním. Nebyl zjištěn žádný vliv NAT2 metabolického genotypu na hladinu DNA aduktů v placentách sledovaných žen. Ze sledovaných faktorů nejvíce přispívala ke vzniku DNA aduktů expozice tabákovému kouři. Účast ostatních faktorů (metabolický genotyp, doba porodu, znečištěné ovzduší) byla ovlivněna u silných kuřaček expozicí tabákovému kouři. Data získaná v této studii také naznačila, že glutathion S-transferáza M1 hraje významnou roli v detoxifikačním procesu DNA-reaktivních meziproductů především při nižších expozicích (v letním období, u nekuřáků).

Autoři Binková et al. (1998a) zkoumali schopnost tvorby DNA aduktů vlivem EOM z ovzduší z oblasti severních Čech a z koksovacích pecí. V této studii byly hrubé extrakty frakcionované do sedmi frakcí na základě jejich acidity. V acelulárním testu in vitro byla použita CT-DNA inkubovaná s oběma typy vzorků za podmínek metabolické aktivace i bez ní. Pro detekci DNA aduktů byla použita metoda ³²P-postlabelingu. Výsledky ukázaly, že spektra hlavních DNA aduktů v rámci frakcí jsou podobná jak u městských vzorků ze severních Čech, tak i u vzorků z koksovacích pecí. Nejvyšší úroveň DNA aduktů byla za podmínek metabolické S9-aktivace zjištěna u neutrální aromatické frakce, následovaná mírně polární a kyselou frakcí pro vzorky z obou zdrojů. Z této aromatické frakce byly identifikovány DNA adukty pravděpodobně odvozené z diolepoxidu: 9-hydroxy-benzo[a]pyren, benzo[a]pyren-r-7, t-8-dihydrodiol-t-9, 10-epoxid [±], benzo[b]fluoranten, benzo[j]fluoranten, benzo[k]fluoranten, chrysen, benzo[a]anthracen, a indeno[1,2,3-cd]pyren. Tyto adukty představovaly asi 57% celkových DNA aduktů aromatické frakce.

Autoři Topinka et al. (1998) použili podobný přístup, jako v případě studia genotoxicity komplexních směsí extraktů z ovzduší, pro analýzu směsi látek obsažených v koksárenských emisích. Hrubý extrakt z extrahovatelné organické hmoty byl frakcionován podle acidity a polarity. Jednotlivé frakce byly pak inkubovány s kulturami

hepatocytů potkana, buňkami V79NH a lidskou plicní nádorovou linií NCI-H322. Nejprve byly otestovány buňky z hlediska jejich schopnosti indukovat DNA adukty po inkubaci s vybranými PAU a nitro-PAU. Zároveň na hepatocytech byly testovány syntetické směsi tří až osmi PAU a nitro-PAU pro odhad jejich vzájemné interakce při indukci DNA aduktů. Hladiny DNA aduktů byly detekovány pomocí metody ^{32}P -postlabeling. Po inkubaci s hrubým (tedy nefrakcionovaným) extraktem byly DNA adukty detekovány ve všech typech buněčných kultur. Nejvyšší množství aduktů bylo nalezeno v hepatocytech, až 80% v neutrální frakci, která obsahovala hlavně PAU a jejich deriváty. Jestliže se před aplikací PAU ke kultuře hepatocytů přidal 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin (TCDD) (aktivuje cytochrom P450 1A1), hladiny PAU-DNA aduktů se zvýšily, zatímco hladiny nitro-PAU-DNA aduktů se snížily. Hladiny DNA aduktů u buněk NCI-H322 se pohybovaly v rozmezí od 10 do 100 aduktů/ 10^8 nukleotidů. Hladiny nitro-PAU-DNA aduktů od 0,2 do 30 aduktů/ 10^8 nukleotidů. Naopak u buněk V79NH (mají schopnost metabolicky aktivovat nitro-PAU) se neprojevila žádná aktivita cytochromu P450 a PAU adukty nebyly detekovány. U této buněčné linie se hladiny nitro-PAU aduktů pohybovaly v rozmezí 10 až 300 aduktů/ 10^8 nukleotidů. V celkové genotoxicitě byl však jejich příspěvek výrazně nižší než v případě PAU. Pomocí další frakcionace neutrální frakce podle polaritě a její testování na genotoxicitu se ukázalo, že nejvyšší hladiny DNA aduktů vyvolává aromatická frakce obsahující PAU. Použití analýzy DNA aduktů u potkaních hepatocytů, NCI-H322 a v buňkách V79NH nabízí slibný přístup ke stanovení genotoxické aktivity PAU a nitro-PAU, použitelné ve všech vzorcích jakékoli komplexní environmentální směsi.

Kromě monitorovacích stanic v Teplicích a Prachaticích přibýly později dvě nové stanice v Praze. Jedna u ústí Strahovského tunelu na Smíchově, tato oblast je charakteristická silnou dopravní zátěží, a druhá v Libuši, jako tzv. pozad'ová stanice. Během let 2000-2004 byla naměřena nejvyšší koncentrace oxidů dusíku (NO_x) a CO na monitorovací stanici na Smíchově, což bylo způsobeno zejména dopravním zatížením. Dále byly měřeny koncentrace PM_{10} , které se ale výrazně nelišily mezi jednotlivými lokalitami, a PAU, u kterých byly naměřeny nejnižší hodnoty v Prachaticích, zatímco na ostatních místech byly hodnoty poměrně vysoké (nejvyšší na Smíchově). Naměřené koncentrace karcinogenních PAU byly ve všech lokalitách podobné, kromě Prachatic, kde byly asi poloviční (Beneš a Skorkovský, 2005).

Do seznamu znečištěných oblastí se v minulém desetiletí přidalo i hlavní město České republiky, Praha. Oproti severním Čechám, kde míra znečištění ovzduší v posledním desetiletí poklesla, v Praze tomu bylo naopak. Ve studii Binková et al. (2003) bylo cílem zhodnotit biologickou aktivitu komplexních směsí organických látek vázaných na částice PM₁₀ získané během letních a zimních období 2000-2001 ve třech monitorovacích stanicích - Teplice, Praha-Smíchov a Praha-Libuš. K hodnocení biologické aktivity byly použity in vitro testy: test bakteriální mutagenity s použitím *Salmonella typhimurium*, kmenů TA98 a YG1041, acelulární test calf thymus DNA s použitím ³²P-postlabelingu k hodnocení schopnosti tvorby DNA aduktů a test embryotoxicity (CHEST). Rozdíly v hladinách DNA aduktů vzniklých s metabolickou aktivací nebyly významné v zimním období mezi jednotlivými lokalitami. Zimní vzorky indukovaly vyšší hladiny DNA aduktů (3-4 krát) než letní vzorky. Hlavní DNA adukty byly tvořeny stejnými typy chemických látek nezávisle na lokalitě a sezóně. Hlavní DNA adukty typické pro danou lokalitu nalezeny nebyly. Tyto hlavní DNA adukty tvořily asi 80% celkových hladin aduktů a byly odvozeny od benzo[a]pyrenu, benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, chrysenu, benz[a]anthracenu a indeno[1,2,3-cd]pyrenu. Přibližně 30% z nich bylo nalezeno u letních vzorků a asi 48% u zimních vzorků. Dále byla provedena analýza obsahu PAU ve vzorcích extrahovatelné organické hmoty adsorbované na částice ovzduší. Zimní vzorky obsahovaly 4-6 krát více benzo[a]pyrenu než letní vzorky. Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami byly nevýrazné. Ve vzorcích bylo pozorováno také rozdílné zastoupení karcinogenních PAU během zimního a letního období. V zimních vzorcích byly zastoupeny benz[a]anthracen a chrysen (lokální topeniště jako významný zdroj emisí), zatímco v letních vzorcích byly více zastoupeny benzo[g,h,i]perylene a indeno[1,2,3-cd]pyren (automobilová doprava). Tyto údaje o karcinogenních PAU mohou být užitečné pro epidemiologické studie vlivu znečištěného ovzduší na zdraví obyvatel a mohou pomoci ke zlepšení našeho životního prostředí.

Autoři Topinka et al. (2005a) se zabývali znečištěním ovzduší našeho hlavního města a jeho genotoxickými účinky v in vivo studii na městských strážnicích. Hladiny DNA aduktů v lymfocytech strážníků sloužily jako biomarker biologicky efektivní dávky expozice karcinogenním PAU. Policisté byli vybráni jako cílová skupina proto, že většinu své pracovní doby tráví venku v ulicích Prahy. Výsledky ukázaly, že v zimním období byli strážníci nejvíce exponováni karcinogenním PAU, 3-4 krát více než v ostatních třech ročních obdobích. Hladiny DNA aduktů v lymfocytech byly v zimním období nejvyšší.

Dále byly zkoumány genetické polymorfismy v genech kódujících různé enzymy, které se účastní aktivace a detoxikace xenobiotik. Kombinace genotypů v genech pro enzymy CYP1A1, které se účastní aktivace karcinogenních PAU, a GSTM1 (glutathion S-transferáza) účastníci se jejich detoxikace, má na DNA adukty významný vliv.

V roce 2008 byl zahájen další program s názvem Program Ostrava, který je tvořen podprojekty AIRGEN a AIRTOX. Cílem tohoto programu je studovat vliv znečištěného ovzduší na populaci v Ostravě a objektivně posoudit, jestli expozice komplexním směsím látek navázaných na prachové částice (zejména karcinogenní PAU) i volatilní organické částice v ovzduší ovlivňují lidský organismus.

Při srovnání koncentrací $PM_{2,5}$ a B[a]P v ovzduší (dle ČHMÚ 2009, viz tabulka 1) mezi Prahou a lokalitami v Moravskoslezském kraji (MSK) je např. v Ostravě-Porubě koncentrace B[a]P 3 krát vyšší než v Praze-Smíchově, v Ostravě-Bartovicích 10 krát a v Karvině 8 krát vyšší. V této oblasti MSK jsou velmi vysoké koncentrace karcinogenních PAU, dokonce nejvyšší ze zemí EU, ve frakci jemných prachových částic. Nejvíce znečištěnou oblastí v České republice je Ostrava-Bartovice, kde měsíční koncentrace B[a]P v r. 2009 překračovala doporučený standard WHO (1 ng/m^3) po celý rok, kromě měsíce července.

Ve studii autorů Topinka et al. (2010) byla zkoumána genotoxicita vyvolaná extrakty komplexních směsí organických látek vázaných na respirabilní prachové částice $PM_{2,5}$ a změny genové exprese indukované EOM v lidských buněčných liniích: HEL (lidské embryonální fibroblasty) a A549 (buňky lidského alveolárního adenokarcinomu, model plicních epitelálních buněk) ve čtyřech lokalitách České republiky (Ostrava-Bartovice, Ostrava-Poruba, Třeboň, Karviná). Genotoxicita byla stanovena analýzou DNA aduktů s využitím metody ^{32}P -postlabeling. Genová exprese byla hodnocena s použitím celogenomových čipů Human HT-12 v3 Expression BeadChip Kit, Illumina. Ve vzorcích EOM byla měřena koncentrace třinácti PAU- fenantrenu, antracenu, fluorantenu, pyrenu, koronenu, benz[a]antracenu, chrysenu, benzo[b]fluorantenu, benzo[k]fluorantenu, benzo[a]pyrenu, dibenzo[a,h]antracenu, bezno[ghi]perylenu a indeno[1,2,3-cd]pyrenu. Z výsledků bylo patrné, že koncentrace $PM_{2,5}$ byla 3 krát vyšší v obou ostravských lokalitách než v Třeboni. Ostrava-Bartovice i Ostrava-Poruba měly podobné hodnoty $PM_{2,5}$ (36,7 vs. 25,8 $\mu\text{g } PM_{2,5}$), ale v Bartovicích byly trojnásobně vyšší koncentrace B[a]P a karcinogenních PAU. Pomocí metody ^{32}P -postlabeling byly získány autoradiogramy, které vykazovaly diagonální radioaktivní zóny (DRZ) po 24hodinové expozici DNA

jednotlivým extraktům (10, 30, 60 µg EOM/ml média). DRZ jsou typické pro indukci mnoha individuálních DNA aduktů komplexními směsmi genotoxických látek vázanými na prachové částice. DRZ vznikají překryvem mnoha stop (spotů), které odpovídají jednotlivým aduktům. Adukty indukované samotným B[a]P, respektive jeho hlavním metabolitem B[a]P-diolepoxidem, jsou patrné zejména v buňkách A549. Nejvyšší genotoxicita byla prokázána v lokalitě Ostrava-Bartovice, kde byla 2-6 násobná ve srovnání s ostatními lokalitami. Z výsledků analýzy genové exprese bylo zřejmé, že počet deregulovaných genů výrazně vzrostl s dávkou EOM pro buňky HEL i A549 a EOM ze všech lokalit. Nejvyšší počet deregulovaných genů byl u vzorků z lokality Ostrava-Bartovice. Při porovnání genové exprese v buňkách HEL po ovlivnění extrakty z Ostravy-Bartovic a Ostravy-Poruby byla zjištěna zvýšená aktivita genů účastnících se regulace buněčného cyklu, signální dráhy tumor-supresorového genu p53 a procesu nádorového bujení malých plicních buněk v kulturách ovlivněných extraktem z Ostravy-Bartovic. Tyto změny mohou znamenat zvýšení rizika vzniku nádorového onemocnění.

3.5. Oxidační stres

Oxidační stres je stav vyvolaný nerovnováhou mezi hladinami antioxidantů v organismu a faktorů působících jako oxidanty (Scandalios, 2002). U organismů využívajících aerobní metabolismus, včetně člověka, je oxidační poškození přirozeným jevem, proti kterému existují účinné obranné a reparační mechanismy. Reaktivní formy kyslíku mohou mít původ endogenní, ty vznikají uvnitř organismu, a exogenní, které jsou součástí zevního prostředí. ROS se rozdělují podle chemické povahy na látky radikálové a neradikálové. Mezi nejvýznamnější ROS patří superoxid, hydroxylový radikál, peroxid vodíku nebo peroxyinitrit. Hlavní endogenní zdroj oxidace v organismu je proces aerobní respirace, při kterém se uvolňují elektrony z mitochondriálních membrán a dojde k vytvoření superoxidu, který je velmi silným oxidačním činidlem. Oxidaci doprovází zánětlivé procesy a metabolické reakce, kterých se účastní cytochrom P450. Mezi exogenní zdroje oxidantů řadíme faktory životního stylu (strava, kouření, tělesná aktivita) a kvalitu životního prostředí, zejména znečištění ovzduší. Všechny tyto faktory, stejně jako i proces stárnutí, jsou spojeny s oxidačním stresem, nebo nedostatečnou detoxifikací ROS.

Za normálních podmínek je superoxid přeměněn superoxid dismutázami na peroxid vodíku, ten je dále rozložen katalázami, nebo glutathion peroxidázami na vodu. Pokud ale vystavení se oxidantům trvá delší dobu, nebo je expozice příliš vysoká, přirozená antioxidační ochrana organismu selhává. Dochází k oxidačnímu stresu a indukci oxidačního poškození, které může postihnout všechny typy makromolekul (DNA, lipidy, proteiny). Oxidační poškození makromolekul je spojováno se vznikem nádorových onemocnění, nemocemi dýchacího traktu i kardiovaskulárního systému (Klaunig et al., 2004). Pochopení drah, které vedou k indukci antioxidačních reakcí, umožní rozvoj strategií pro ochranu před oxidačním poškozením.

Prachové částice, zvláště pak částice o aerodynamickém průměru menším než 10 μm (PM_{10}), a látky na ně navázané vyvolávají imunitní reakce organismu doprovázené tvorbou ROS, které pak mohou vést k oxidačnímu stresu. Expozice ROS je také spojována s vyšším výskytem astmatu (Delfino, 2002).

Nejzávažnější z hlediska dopadu na lidské zdraví je oxidační poškození DNA. Dochází ke změnám struktury bází, a to ovlivňuje jejich schopnost párovat se s komplementárními bázemi v druhém řetězci DNA (Cooke et al., 2003). Konečným důsledkem může být vznik mutací.

Nejčastějším produktem oxidace bází v DNA je 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosin (8-oxodG), který je používán jako jeden z hlavních biomarkerů oxidačního poškození v mnoha studiích. 8-oxodG se páruje místo cytosinu s adeninem. Pokud tato chyba není včas odhalena a opravena reparačním systémem buňky, dojde v dalším replikačním cyklu k fixaci této mutace.

Transverze GC-TA je tedy důsledkem přítomnosti 8-oxodG v DNA. Organismus má však vyvinutý mechanismus odstraňování takto poškozených bází. 8-oxodG je vyštěpen z DNA pomocí enzymu 8-oxoguanin DNA glykosylázy/AP lyázy a je vyloučen v moči. Jeho hladinu můžeme v moči změřit a tím stanovit míru poškození DNA oxidací.

Působení ROS na lipidy a nenasycené mastné kyseliny způsobuje, že dojde k vytváření reaktivních lipid peroxidů, které reagují s dalšími molekulami v buňce, a tím šíří oxidační poškození (Montuschi et al., 2004). Peroxidované lipidy mohou ovlivnit oxidaci dalších makromolekul (DNA, proteiny). V buněčných membránách peroxidované lipidy způsobují změny fluidity a inaktivují membránově vázané proteiny. Rozsah peroxidace lipidů se dá stanovit měřením produktů rozkladu lipid peroxidů. K tomuto měření se využívá často sledovaný marker malondialdehyd (MDA). Jeho přítomnost se

stanovuje pomocí reakce s kyselinou thiobarbiturovou. Nevýhodou tohoto měření je relativně nízká specifita a také velmi malé množství (asi 1%) MDA v peroxidovaných lipidech. Místo toho se začaly používat isoprostany jako markery peroxidace lipidů (Roberts et al., 2000).

Isoprostany vznikají působením ROS na arachidonovou kyselinu v buněčných membránách. Z membrán jsou pak odštěpovány působením fosfolipáz a poté cirkulují v plazmě, nebo jsou vyloučeny v moči. Plazma i moč se dají využít ke stanovení hladiny isoprostanů v biologických studiích. Nejlépe prostudovaným zástupcem isoprostanů je 15-F2t-isoprostan (15-F2t-IsoP), který je v současné době považován za nejspolehlivější marker peroxidace lipidů. Byla prokázána souvislost mezi některými nemocemi a zvýšenými hladinami 15-F2t-IsoP. Na rozdíl od 8-oxodG představuje 15-F2t-IsoP molekulu, jejíž přítomnost v krevní plazmě a moči je přímo ovlivněna působením ROS na organismus.

Vlivem ROS na proteiny dochází k tvorbě karbonylových skupin na postranních řetězcích aminokyselin, zejména prolinu, argininu, lysinu a treoninu, ke zlomům a chybnému skládání molekul proteinů. Oxidované proteiny mají narušenou funkci a transport. Buňka nemá žádný reparační systém pro takto změněné proteiny. Poškozené proteiny je ale schopna rozpoznat, označit a degradovat (Dalle-Donne et al., 2003; 2006). Vysoká koncentrace proteinů v krevní plazmě je vhodná pro stanovení oxidace proteinů. Nejčastěji je určována pomocí metody založené na vazbě dinitrofenylhydrazinu na karbonylové skupiny proteinů a použití protilátky proti dinitrofenylhydrazonu. Ten vznikne v místě vazby karbonylové skupiny.

3.5.1. Oxidační poškození DNA

3.5.1.1. Oxidační poškození DNA ve zvířecích a in vitro modelech

Gábelová et al. (2007) hodnotila oxidační poškození DNA vzniklé působením komplexních směsí z ovzduší. Byly stanoveny hladiny 8-oxodG v lidské buněčné línii HepG2. Kultivované buňky byly exponovány koncentrací 5-150 µg/ml EOM a oxidační poškození bylo analyzováno s použitím kometového testu (SCGE, single cell gel electrophoresis, comet assay), který zahrnuje inkubaci buněčné DNA se specifickými endonukleázami, které štěpí oxidovanou DNA v místech 8-oxodG. EOM byla extrahována

z PM₁₀ z letních a zimních vzorků tří evropských měst (Praha, Sofie, Košice). Nebylo pozorováno žádné zvýšení oxidace DNA v závislosti na čase a dávce, kromě Košic v letním odběru. V buňkách exponovaných letním EOM se po 2 hod. zvýšilo oxidační poškození DNA u tří z celkem šesti koncentrací. Průměrné hodnoty 8-oxodG byly u těchto koncentrací v rozmezí 15,3 – 26,1 na 10⁶ nukleotidů a 3,5 na 10⁶ nukleotidů u neexponovaných buněk. B[a]P (pozitivní kontrola) vyvolal v buňkách HepG2 variabilní, ale nevýznamné nárůsty oxidačního poškození DNA (cca 1,6 násobné zvýšení nad hodnotu kontroly). Autoři uzavírají, že EOM vzorky extrahované z částic PM₁₀ se jen velmi okrajově účastní indukce oxidačního poškození DNA.

Ve studii autorů Hanzalová et al. (2010) byla zkoumána role oxidačního poškození v mechanismu účinku vybraných karcinogenních PAU (benzo[a]pyrenu, dibenzo[a,l]pyrenu), umělé směsi karcinogenních PAU (k-PAU mix) a extrahovatelné organické hmoty z částic z ovzduší z městského prostředí. Dvě buněčné linie (lidské buňky hepatomu HepG2, lidské diploidní plicní fibroblasty HEL) byly vystaveny po dobu 24 a 48 hodin různým koncentracím sloučenin a směsí. K hodnocení oxidačního poškození byly použity markery oxidačního stresu 8-oxodG, 15-F2t-IsoP a karbonylové skupiny proteinů. Reakce buněčných linií na testované sloučeniny se značně lišily. V buňkách HepG2 nebylo vyvoláno oxidační poškození jednotlivými karcinogenními PAU ani umělými směsmi karcinogenních PAU, ale EOM zvýšily hladiny 8-oxodG v těchto buňkách. V buňkách HEL nevyvolala oxidační poškození DNA žádná z daných látek. Peroxidace lipidů, měřená jako hladina 15-F2t-IsoP, byla indukována karcinogenními PAU v HepG2 buňkách pouze po 48 hodinové inkubaci, zatímco efekt EOM byl pozorován už po 24 hodinách. V buňkách HEL jednotlivé karcinogenní PAU a směsi syntetických PAU obecně snížily hladiny 15-F2t-IsoP. Oxidace proteinů nebyla vyvolána po 24 hodinovém působení žádnou směsí v žádné buněčné linii. Jednotlivé karcinogenní PAU a umělé směsi karcinogenních PAU obecně indukovaly oxidaci proteinů v obou buněčných liniích po 48 hodinovém působení, s výjimkou DB[a,l]P v buňkách HepG2. Oxidační poškození proteinů způsobené EOM bylo obecně větší v buňkách HepG2 po 48 hodinové inkubaci, zatímco v HEL buňkách byl pozorován efekt pouze pro jednu dávku EOM. Tyto výsledky ukazují na schopnost EOM indukovat oxidační poškození DNA a lipidů po 24 hodinovém působení a proteinů po 48 hod. působení v HepG2 buňkách. Vliv karcinogenních PAU byl podstatně menší. V buňkách HEL byla indukce oxidačního stresu karcinogenními PAU i EOM slabá.

Autoři Bonetta et al. (2009) zkoumali poškození DNA v lidských plicních buňkách A549 vystavených různým extraktům z PM_{2,5} z průmyslových, městských a dálničních lokalit. Organické a ve vodě rozpustné extrakty z PM_{2,5} byly analyzovány pro stanovení obsahu PAU a kovů a testovány na buňkách A549 pomocí kometového testu (s a bez FPG enzymu) k určení genotoxického a oxidačního poškození. Chemická analýza ukázala variabilitu PAU v PM organických extraktech ze tří různých lokalit a poukázala na přítomnost 14 kovů (nejvíce zastoupeny: Fe, Cu, Zn, Sb a Ba) ve všech ve vodě rozpustných PM extraktech. Všechny PM_{2,5} organické extrakty způsobily signifikantní nárůst poškození DNA (závislý na dávce). Genotoxický účinek byl spojen s obsahem PAU v PM_{2,5}; nejvyšší genotoxický účinek byl pozorován u vzorků z dálniční lokality. Oxidační poškození DNA bylo pozorováno pro PM_{2,5} extrakty rozpustné ve vodě u vzorků z průmyslové a dálniční lokality. Rozsah oxidačního poškození závisel na druhu a koncentraci přítomných kovů. Výsledky této studie zdůraznily význam chemického složení PM a potřebu analyzovat vedle velikosti a koncentrace PM i jejich kvalitativní složení, zejména při posuzování účinků na zdraví a expozici.

Glutathion (GSH) je jedním z nejdůležitějších antioxidantů v savcích buňkách. Také hraje důležitou roli v chemické detoxikaci. Některé studie ukazují, že PAU, např. benzo[a]pyren, by mohly zvýšit obsah GSH jako obranného mechanismu proti oxidačnímu stresu a také využít jeho detoxifikační účinek. Nicméně existuje velmi málo studií o úloze GSH a jeho antioxidačních a detoxifikačních účincích. Cílem studie autorů Lin a Yang (2007) bylo analyzovat intracelulární metabolismus glutathionu v lidských buňkách hepatomu (HepG2) při expozici B[a]P. Expozice buněk B[a]P (1-100 μM) po dobu 24 hod. nezpůsobila signifikantní zvýšení buněčné smrti HepG2 buněk. Při koncentraci 10 μM, B[a]P způsobil výrazný nárůst hladin GSH a malý (13%), ale významný pokles aktivity glutathion reduktázy. Nicméně nedošlo k žádné změně v činnosti glutathion peroxidázy a žádné zjistitelné zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS). Při analýze činnosti detoxifikačních enzymů byl zjištěn nárůst aktivity monooxygenáz CYP1A a glutathion S-transferázy. Výsledky této studie ukázaly, že B[a]P způsobil aktivaci detoxifikačních enzymů.

Expozice benzo[a]pyrenu (B[a]P) může vyvolat zánětlivé onemocnění kůže i rakovinu kůže. Obě onemocnění jsou spojena s oxidačním stresem. B[a]P se váže s vysokou specifitou na arylhydrokarbonový receptor (AhR), kterým se mění exprese CYP1A1. Zatímco dosud byly znalosti založeny na datech z kůží myši a z buněčných

kultur, ve studii autorů Costa et al. (2010) byly využity lidské zdravé kůže, které byly exponovány 5 μM B[a]P v podmínkách simulujících expozici pracovnímu a životnímu prostředí. Expres AhR a CYP1A1 byly hodnoceny pomocí testu Western blotting, který odhalil jejich přítomnost i u kontrolních a neexponovaných kůží. Expres obou enzymů se zvýšila dvojnásobně po expozici B[a]P. Oxidační stres byl hodnocen z hlediska redukce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid), oxidace bílkovin a tvorby ROS. Po expozici B[a]P byl pozorován významný nárůst tvorby ROS a karbonylových sloučenin a také snížení životaschopnosti tkáně. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že B[a]P může významně zvýšit expresi receptoru AhR a CYP1A1 a indukci oxidačního stresu v lidské kůži.

Karcinogenní PAU B[a]P a DB[a,l]P jsou rozšířenými polutanty životního prostředí. Autoři Courter et al. (2007) zkoumali vliv výfukových plynů vznětových motorů na B[a]P a DB[a,l]P, které indukovaly PAU-DNA adukty, metabolické aktivace, expresi genů a hladiny 8-oxodG aduktů v kultuře lidských buněk prsního epitelu (MCF-10A). Buňky byly vystaveny expozici výfukovým plynům a B[a]P po dobu 24 a 48 hod., což způsobilo výrazný pokles hladin PAU-DNA aduktů ve srovnání s expozicí samotnému B[a]P. Aktivita enzymu cytochromu P450 (CYP) a CYP1B1 se výrazně zvýšila po expozici výfukovým plynům a DB[a,l]P ve srovnání s expozicí DB[a,l]P samotnému. Také exprese aldoketoreduktáz (AKR)1C1, AKR1C2, a AKR1C3 se výrazně zvýšila v buňkách po expozici výfukovým plynům a PAU, ve srovnání s expozicí PAU samotným. Po expozici samotnému B[a]P nebo výfukovým plynům a B[a]P po 24 hod. se zvýšily hladiny 8-oxodG. Tyto výsledky naznačily, že komplexní směsi mohou změnit karcinogenní potenciál PAU.

Genotoxickými účinky částic $\text{PM}_{2,5}$ se zabývali i Oh et al. (2011). V této studii byl genotoxický potenciál částic $\text{PM}_{2,5}$, odebraných v městě Suwon, Korea, studován pomocí kultivovaných lidských buněk plicního bronchiálního epitelu (BEAS-2B) jako modelového systému pro určení zdravotních rizik při vdechování. Organický extrakt z $\text{PM}_{2,5}$ generoval signifikantní nárůst zlomů v DNA a tvorbu mikrojader v závislosti na dávce (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ až 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Po frakcionaci částic $\text{PM}_{2,5}$ indukovaly neutrální vzorky včetně alifatické, aromatické a slabě polární frakce zlomy v DNA a tvorbu mikrojader. V upraveném kometovém testu s využitím endonukleáz (FPG a ENDOIII) zvýšily organické extrakty a jejich frakce výskyt zlomů v DNA v porovnání s kontrolními skupinami, což naznačuje, že organické extrakty a frakce $\text{PM}_{2,5}$ indukují oxidační poškození DNA. Výsledky v této

studii ukazují, že částice PM_{2,5} shromážděné v oblasti města Suwon zatížené dopravou mají genotoxické účinky a ROS mohou v těchto účincích hrát významnou roli.

3.5.1.2 Oxidační poškození DNA v lidském organismu a in vivo populační studie

Ve studii autorů Singh et al. (2007) byl hodnocen vztah mezi expozicí genotoxickým látkám přítomným v ovzduší a endogenním oxidačním poškození DNA ve třech různých lidských populacích vystavených různým úrovním znečištěného ovzduší. Oxidační poškození DNA bylo měřeno v DNA lymfocytů s využitím biologických markerů: 8-oxodG s použitím metody kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS); cyklického pyrimidopurin N-1, N2 malondialdehyd-2'-deoxyguanosinu (M1dG) s použitím immunoslot-blot testu. Hladina endogenního oxidačního poškození DNA byla výrazně zvýšená u osob exponovaných znečištěnému ovzduší ve srovnání s jedinci neexponovanými, a to v Košicích (8-oxodG adukty) a v Sofii (M1dG adukty). Naopak žádný významný rozdíl nebyl pozorován mezi úrovní endogenní oxidace DNA a expozicí znečištěnému ovzduší u populace z Prahy a Košic. Průměrná hladina aduktů M1dG byla významně nižší u neexponovaných a exponovaných osob z Košic ve srovnání s osobami z Prahy a Sofie. Průměrná hladina 8-oxodG aduktů byla signifikantně vyšší u neexponované a exponované populace z Košic ve srovnání s populací z Prahy. Znečištění životního prostředí může tedy měnit endogenní hladiny oxidačního poškození DNA u lidí.

Autoři Singh et al. (2007) též zkoumali vznik PAU a B[a]P DNA aduktů po expozici znečištěnému prostředí na lidský organismus ve třech metropolitních městech a oxidační poškození DNA. Kromě toho byl také zkoumán antioxidační status (hladiny vitamínů) a genetická vnímavost jednotlivců s ohledem na poškození DNA. Nebyla nalezena žádná významná korelace mezi hladinami vitamínů A, E, C a kyselinou listovou a M1dG a 8-oxodG adukty, stejně jako mezi M1dG adukty a PAU nebo B[a]P DNA adukty. Avšak významná negativní korelace byla zjištěna mezi hladinami 8-oxodG aduktů a hladinami celkových PAU a B[a]P DNA aduktů. Tato korelace byla nejvýznamnější pro osoby-nekuřáky a pro osoby neexponované znečištěnému ovzduší.

Ve studii autorů Rössner et al. (2009) byl zkoumán vliv expozice karcinogenním PAU a VOC na oxidační poškození DNA a peroxidaci lipidů v lidském organismu. Byly sledovány dvě skupiny osob z oblastí s odlišnými hladinami znečištění ovzduší. 60

příslušníků městské policie Praha a 100 osob z Ostravska (příslušníci městské policie, úředníci magistrátu). Pražská skupina byla zvolena jako kontrolní. Byly provedeny zimní i letní odběry. Expozice karcinogenním PAU a VOC byla měřena pomocí personálních monitorů a následně proběhla analýza oxidačního poškození DNA a peroxidace lipidů. Stanovení expozice karcinogenním PAU (benz[a]antracen, chrysen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perylene a indeno[1,2,3,cd]pyren) byla provedena pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Stanovení expozice VOC (benzen, toluen, etylbenzen, m-xylen, p-xylen, o-xylen) byla stanovena plynovou chromatografií s plamenoionizační detekcí. Stanovení 8-oxodG bylo provedeno pomocí metody kompetitivní ELISA. Pro stanovení 15-F2t-IsoP v krevní plazmě byl použit komerční kit od firmy Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Z výsledků vyplynulo, že expozice karcinogenním PAU i B[a]P byla výrazně vyšší na Ostravsku než v Praze v obou odběrových obdobích. Zimní expozice byly v obou oblastech vyšší než letní. Hladiny 8-oxodG v moči se nelišily u obou zkoumaných skupin, ani mezi obdobími. Hladina markeru peroxidace lipidů 15-F2t-IsoP byla signifikantně zvýšena během zimních odběrů u osob žijících na Ostravsku. Peroxidace lipidů byla zvýšena po expozici některým VOC, po expozici karcinogenním PAU a B[a]P. Expozice škodlivým látkám byla 5 krát vyšší během zimních období u osob žijících na Ostravsku než v Praze. Oxidační poškození DNA korelovalo s expozicí PM₁₀ a PM_{2,5}. Ani vysoká expozice znečištěnému ovzduší nezvýšila hladinu 8-oxodG v moči. Nejvýznamnější zjištění této studie je vysoce signifikantní pozitivní korelace mezi personální expozicí karcinogenních PAU a B[a]P a hladinami 15-F2t-IsoP v krevní plazmě. Důsledkem může být zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, nemocí plic, jater, ledvin i neurologických poruch (Pratico et al., 2001).

Studie autorů Rössner et al. (2010) zkoumala vliv znečištěného ovzduší na hladiny markerů oxidačního poškození makromolekul. Cílem byla analýza hladin markerů oxidačního poškození DNA (8-oxodG), lipidů (15-F2t-IsoP) a proteinů (karbonylové skupiny) u skupin městských strážníků z Prahy a administrativních pracovníků a městských strážníků z Ostravy. Vzorky byly odebírány ve třech obdobích (zima 2009, léto 2009, zima 2010). Cílem bylo rozšířit práci Rössner et al. (2009). Pražská skupina byla zvolena jako kontrolní. Výsledky ukázaly na výrazně vyšší hladiny škodlivin v Ostravě než v Praze. Nejnížší expozice polutantům byly v létě 2009, pak zimě 2009 a nejvyšší v zimě 2010. Hodnoty na Ostravsku byly extrémně vysoké díky inverzi v zimě 2010. V zimě 2009

byl zjištěn rozdíl mezi hladinami 15-F2t-IsoP v Praze a na Ostravsku. Tomu také odpovídal rozdíl v průměrné expozici B[a]P v obou lokalitách (Praha 0,80 ng/m³, Ostravsko 3,50 ng/m³). V létě 2009 byly naměřené koncentrace B[a]P nižší (Praha 0,12 ng/m³, Ostravsko 0,43 ng/m³). V zimě 2010 byly velmi vysoké expozice B[a]P (Praha 2,80 ng/m³, Ostravsko 14,80 ng/m³). Další analýzy ukázaly, že při nižších koncentracích B[a]P se hladiny peroxidace lipidů zvyšují lineárně, ale po dosažení vyšších koncentrací B[a]P se již hladina 15-F2t-IsoP téměř nemění. Žádné rozdíly nebyly zjištěny v hladinách 8-oxodG mezi skupinami a též oxidace proteinů se mezi sledovanými skupinami většinou nelišila. Výjimkou bylo letní období 2009, kde byly hladiny karbonylových skupin zvýšené u osob žijících na Ostravsku.

Autoři Rössner et al. (2008) ve své studii zkoumali sezónní variabilitu oxidačního poškození DNA pomocí markeru 8-oxodG v moči 50 řidičů autobusů a 50 kontrolních osob v Praze ve třech obdobích s různou úrovní znečištění ovzduší (zima 2005, léto 2006, zima 2006). Expozice znečišťujícím látkám (karcinogenní PAU, PM a VOC) byla sledována pomocí personálních a stacionárních monitorů. Pro analýzu hladin 8-oxodG byla použita metoda ELISA. Výsledky ukázaly, že řidiči autobusů byli vystaveni vyšším hladinám karcinogenních PAU v zimě 2006, zatímco v dalších dvou obdobích byly expozice vyšší u kontrolní skupiny. Žádné rozdíly v expozici VOC nebyly patrné mezi skupinami v létě 2006 a v zimě 2006. Hladiny 8-oxodG byly vyšší u řidičů autobusu než u kontrol ve všech ročních obdobích.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Odběr vzorků z ovzduší, příprava EOM

Hrubé (1-10 μm), jemné (0,15-1 μm) a kondenzační (0,17-0,5 μm) velikostní frakce aerosolových částic byly sbírány na polyuretanovou pěnu (PUF- polyurethane foam) ve čtyřech různých lokalitách v průběhu zimy 2009. Odběrová místa byla Březno u Chomutova (industriální oblast v blízkosti povrchového dolu), Dobré Štěstí (v blízkosti dálnice D8), centrum Prahy (Benátská ulice) a pozadřová stanice Láz (hráz nádrže na pitnou vodu v rozsáhlém lesním celku, JZ od Příbrami). Vzorky byly odebírány denně (24 hod.): Březno (5.-9.2.2009), Dobré Štěstí (13.-19.2.2009), Praha (4.-14.3.2009) a Láz (18.-26.3.2009) s použitím velkoobjemového kaskádního impaktoru HiVol (BGI 900 USA). Impaktory byly umístěny na střechy mobilních stanic ve výšce 4 m. V Praze byl impaktor ve výšce 25 m nad úrovní ulice.

Extrakce organické hmoty z PUF byla provedena dichlormethanem, chemickou analýzu polycyklických aromatických uhlovodíků provedla akreditovaná firma ALS Česká republika, s.r.o., Praha (EN ISO CSN IEC 17025). Stanovení bylo provedeno s použitím standardních metod US EPA (EPA Report, 1984; 1999). V každém vzorku byla analyzována koncentrace třinácti PAU – fenantrenu, antracenu, fluorantenu, pyrenu, koronenu, benz[a]antracenu, chrysenu, benzo[b]fluorentenu, benzo[k]fluorantenu, benzo[a]pyrenu, dibenzo[a,h]antracenu, benzo[ghi]perylenu a indeno[1,2,3-cd]pyrenu. Pro in vitro experimenty byly vzorky EOM po extrakci dichlormethanem odpařeny pod proudem dusíku. 1,2-propandiol (100 μl) byl použit jako tzv. keeper, aby se zamezilo úniku PAU během odpařování. Odparky byly rozpuštěny v dimetylsulfoxidu (DMSO). Každý vzorek EOM pak obsahoval 50 mg EOM v 1 ml DMSO. Extrakty byly uchovávány v mrazicím boxu při -80°C až do zahájení analýzy.

4.2. In vitro acelulární test, ^{32}P -postlabeling

Nativní DNA z telecího brzlíku (calf thymus DNA, CT-DNA) (1 mg/ml) byla inkubována se vzorky extraktů (100 μg EOM/ml) za aerobních podmínek bez a s metabolickou aktivací s použitím S9 mikrosomální frakce izolované z jater krys (S9, Toxila, Pardubice-Rybitví, 1 mg bílkoviny/ml). Doba inkubace byla 24 hod., při teplotě

37°C, v prostředí S9 pufru, pH 7.4. Inkubační směs pro S9 aktivaci zahrnovala v konečných objemech: 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glukóza-6-fosfát, 4 mM NADP, 100 mM fosfátový pufr pH 7.4, 0,5 mg/ml S9 frakce.

Jako pozitivní kontrola byl používán benzo[a]pyren (10 µg/ml). Inkubace byla ukončena přidáním stejného objemového množství směsi CIP (chloroform:isoamylalkohol:fenol = 24:1:25) používané k extrakci DNA (Binková et al., 1999).

4.2.1. Princip stanovení DNA aduktů polyaromatických látek („bulky aromatic adducts“) metodou ³²P-postlabelingu

Princip metody sestává z několika následných biochemických reakcí (obr. 3). DNA izolovaná z buněk nebo tkáně je nejprve enzymaticky hydrolyzována působením směsi enzymů (mikrokokální nukleáza a fosfodiesteráza) na nukleosid-3'-monofosfáty. Dalším krokem je separace modifikovaných nukleotidů od nukleotidů intaktních. Jedna možnost využívá k oddělení DNA aduktů extrakce do butanolové fáze. Druhá možnost využívá specifické enzymové aktivity nukleázy P1, která odštěpuje zbývající fosfát z nukleosid-3'-monofosfátu preferenčně u normálních nukleotidů. Takto vzniklé nukleosidy jsou špatným substrátem pro T4-polynukleotidkinázu, která přenáší radioaktivní fosfát z adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na nukleosid-3'-monofosfáty. Chemická povaha a typ studovaných aduktů jsou klíčové pro volbu mezi butanolovou extrakcí a použitím nukleázy P1. Oba tyto postupy pro stanovení DNA aduktů byly srovnávány ve studii Gupta a Earley (1988) pro více než 70 karcinogenních a genotoxických látek. Autoři Whong et al. (1992) zase porovnávali oba postupy na plicních buňkách potkana pro několik typů látek in vitro i in vivo.

Dalším krokem je značení modifikovaných nukleosid-3'-monofosfátů radioaktivním fosforem. Ten je přenesen ve formě fosfátu z [³²P]-ATP, který je přítomen v molárním nadbytku, na 5'-hydroxylový konec modifikovaných nukleotidů působením T4-polynukleotidkinázy. Tímto vznikne nukleosid-3',5'-bifosfát. Takto označené adukty jsou poté rozděleny vícerozměrnou tenkovrstvou chromatografií (TLC, thin-layer chromatography) s použitím polyethylenimin-celulosových folií. Chromatografie ve směrech D1, D2 a D5 se používá k odmytí nežádoucích radioaktivních komponent pro dosažení optimálního pozadí (obr.4). Chromatografie D3 a D4, které obsahují mobilní fázi o vysoké iontové síle, s kyselým (D3) nebo alkalickým (D4) pH, se používají k rozdělení aduktů s rozdílnou pohyblivostí, která je určována jejich chemickou strukturou. Separace

aduktů je závislá na celkové iontové síle, pH, koncentraci močoviny a také povaze aniontů. Vyvolané chromatogramy jsou vyhodnocovány autoradiograficky s použitím citlivého rentgenového filmu. Délka expozice je 1-5 dnů při -80°C pro detekci 1 aduktu v 10^8 - 10^{10} nukleotidech. Radioaktivita se měří na scintilačním spektrometru a hladina DNA aduktů se vyjadřuje počtem aduktů na 10^8 nukleotidů.

4.2.2. Postup stanovení DNA aduktů polyaromatických látek metodou ^{32}P -postlabelingu

Metoda ^{32}P -postlabelingu byla vyvinuta na počátku osmdesátých let minulého století jako citlivý a obecně použitelný způsob detekce modifikovaných bází DNA. Poprvé byla popsána Randerathem et al. (1981) a Guptou et al. (1982). Od té doby byla tato metoda několikrát pozměněna pro dosažení co nejvyšší citlivosti (např. Gupta, 1985; Reddy a Randerath, 1986 a další).

DNA adukty byly stanoveny podle uvedeného schématu na obr. 3. Po ukončení inkubace CT-DNA se vzorky extraktů byla DNA přečištěna přidáním 1M Tris (pH=8) + 5M NaCl + CIP. Po intenzivním protřepání a centrifugaci byla odebrána vrchní vodná fáze a k ní přidána směs CI (chloroform:izoamylalkohol = 24:1), po další centrifugaci byla z odebrané vrchní vodné fáze vysrážena DNA etanolem (5M NaCl + ledový absolutní etanol). Po odsátí etanolu byly zkumavky s DNA vysušeny, pelety DNA byly rozpuštěny v redestilované H_2O podle množství vysrážené DNA. Po rozpuštění DNA byla změřena její absorbance na spektrofotometru při 260 nm a poté pomocí této změřené hodnoty vypočítána koncentrace DNA. Poměr absorbancí A_{260}/A_{280} slouží pro kontrolu čistoty DNA. Tento poměr by měl být kolem hodnoty 1,8 pro čistou DNA (bez kontaminace RNA a proteiny). Vyšší hodnota ukazuje na kontaminaci RNA, zatímco nižší na kontaminaci bílkovinami. Vzorky byly poté uloženy do mrazícího boxu na -80°C .

Vlastní postlabelingový experiment byl proveden následujícím způsobem. Nejdříve je hydrolyzována DNA působením směsi enzymů (mikrokolální nukleáza MN a fosfodiesteráza SPD) na nukleosid-3'-monofostáty. Objemové množství vzorku odpovídající 6,0 μg DNA bylo doplněno redestilovanou H_2O na celkový objem 7,5 μl . Dále bylo přidáno 7,5 μl enzymového mixu MN (50 U MN/ml; Sigma) / SPD (1 mg SPD/ml; ICN Biomedicals, Inc.). Vzorky byly inkubovány v termobloku 4 hodiny při 37°C . Po skončení inkubaci byly vzorky krátce zcentrifugovány a z každého vzorku bylo

odpipetováno 2,5 μ l pro stanovení koncentrace nukleotidů (dC, dG, dT, dA) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography) s UV detekcí. Takto upravené vzorky byly zamrazeny v kapalném dusíku a uchovány v mrazícím boxu při -20°C až do HPLC analýzy. Zbývajícím objem 12,5 μ l (odpovídá cca 5 μg DNA) byl dále podroben obohacovacím postupům (nukleáza P1) buď bezprostředně po skončení hydrolýze, nebo byly vzorky zamrazeny a uchovány do druhého dne v mrazícím boxu při -20°C .

Další krok zahrnuje obohacení DNA aduktů s využitím specifické enzymové aktivity nukleázy P1. Vzorky byly inkubovány se směsí P1 (1 μ l nukleázy P1; 1 μ l 0,64 M Na acetátu pH=5; 1 μ l 3,2 mM ZnCl_2) v termobloku 30 minut při 37°C . Po skončení inkubace byl ke každému vzorku přidán 1,36 M Tris. Vzorky byly uchovány v lednici popř. i zamrazeny při -80°C po dobu, než bylo provedeno značení v izotopové laboratoři (nejdéle však 3 dny).

Dalším krokem bylo značení DNA aduktů pomocí fosforu ^{32}P . Ke každému vzorku byl přidán ATP-mix, který se skládá ze značícího pufru (230 mM bicin; 115 mM MgCl_2 ; 115 mM dithiotreitol; 5,8 mM spermidin; pH=9), T4-polynukleotidkinázy (30 U/ μ l), redistilované vody a ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; Amersham Biosciences). Vzorky byly inkubovány v termobloku 30 minut při teplotě 37°C . Po skončení inkubace byly vzorky naneseny na chromatografické fólie.

Označené DNA adukty byly v dalším kroku děleny vícerozměrnou tenkovrstvou chromatografií (TLC) s použitím polyethylenimin-celulosových folií (20x20 cm, 0,1 mm; Macherey-Nagel, Německo) (obr. 4). Chromatografie ve směrech D1, D2 a D5 byla použita k odmytí nežádoucích komponent pro dosažení optimálního pozadí. Chromatografie D3 a D4 k rozdělení aduktů s rozdílnou pohyblivostí za daných chromatografických podmínek.

Vzorky byly naneseny na vyznačený počátek OR (origin) chromatografické folie a vloženy do chromatografických tanků s roztokem D1 (1 M fosforečnan sodný, pH=6,8) a vyvíjeny přes noc. Druhý den ráno byly odstříhnuty filtrační pásy podle vyznačené linie a folie byly promývány 20 minut v destilované vodě. Po promytí byly folie 15-20 minut sušeny. Suché folie byly ponořeny do roztoku D2 (2,5 M mravenčan amonný, pH=3,5) a vyvinuty až po OR. Poté byly ihned vloženy do tanku s roztokem D3 (3,5 M LiF; 8,5 M močovina, pH=3,5) a vyvíjeny 3,5 hodiny. Po této době byly u folií odstříhnuty vrchní 2 cm pásy a folie byly rozstříhnuté uprostřed dle vyznačených linií. Poté byly opět promyty

v destilované vodě (20 minut) a vysušeny stejným způsobem jako po roztoku D1. Suché fólie byly krátce ponořeny ve směru chromatografie D4 do roztoku D4-A (0,5 M Tris, pH=8) ve fotografické misce a ihned vloženy do chromatografického tanku s roztokem D4 (0,8 M chlorid lithný; 0,5 M Tris; 8,5 M močovina; pH=8) a vyvíjeny 2,5 hodiny. Po skončení byly fólie opět promyty (20 minut) a vysušeny jako v předchozích krocích. K vysušeným fóliím byly přisponkovány filtrační pásy 10x7 cm na koncovou stranu chromatografie D4. Poté byly takto upravené folie vloženy do tanku s roztokem D5 (D5=D1, 1 M fosforečnan sodný, pH= 6,8) a vyvíjeny přes noc. Následující den byly odstřiženy filtrační pásy, fólie byly opět promyty a vysušeny. Každá fólie byla označena fluorescenčním perem a umístěna do autoradiografických kazet spolu s filmem (X-ray Kodak, Sigma). Následně byly exponovány v mrazícím boxu při teplotě -80°C po dobu 1-5 dnů, podle očekávaných hladin DNA aduktů.

Vyvolané rentgenové filmy představují mapu DNA aduktů, resp. spotů, na chromatografických fóliích pro jednotlivé analyzované vzorky. Pro daný set vzorků se zvolila vhodná šablona mapy spotů a diagonální radioaktivní zóny (DRZ) pro jejich vystřížení. Vystřížené spoty a DRZ byly umístěny do scintilačního koktejlu (scintilační koktejl LSC SigmaFluo TM) a jejich aktivita byla změřena na scintilačním počítači (LS counter, Wallac 1409, Pharmacia).

Pro výpočet hladin DNA aduktů je nutné znát celkovou koncentraci nukleotidů v analyzovaných vzorcích. Analýza alikvótů jednotlivých vzorků oddělených po hydrolýze DNA byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí. Kalibrace pro jednotlivé nukleotidy byla provedena v rozsahu koncentrací 10 – 30 ng (standarty: dC, dG, dT, dA-3'-monofosfát, Sigma). K rozmraženým alikvótům vzorků DNA po hydrolýze (2,5 µl) bylo přidáno 37,5 µl redestilované vody. Poté byly vzorky zvortexovány a zcentrifugovány. Analýza vzorků byla provedena pomocí programu Millenium (Waters). Z výsledků koncentrací jednotlivých nukleotidů byla vyhodnocena jejich sumací koncentrace DNA ve vzorku (µg DNA), která byla použita v postlabelingového experimentu.

Výpočet hladin DNA aduktů v analyzovaných vzorcích byl proveden v programu EXCEL5. Pro výsledný počet DNA aduktů – Z v daném vzorku platí vztah:

$$Z \text{ (DNA adukty/10}^8 \text{ nukleotidů)} = 0,00501 \times \frac{Y_{\text{CPM}}}{X_{\mu\text{gDNA}}}$$

Množství DNA ve vzorku X (μg DNA) bylo vyhodnoceno z HPLC analýzy nukleotidů. Dále byla provedena korekce výsledků měření (CPM) analyzovaných vzorků podle CPM blankových vzorků, a to pro jednotlivé spoty (DNA adukty) i DRZ. Poté byla ještě vypočítána hladina DNA aduktů standardů B[a]P-DNA, které se používají při každém postlabelingovém experimentu pro kontrolu všech postupů. (Binková et al., 1998a)

4.3. ELISA

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) je biochemická technika používaná hlavně v imunologii k odhalení přítomnosti protilátky nebo antigenu ve vzorku. ELISA bývá používána jako diagnostický nástroj v oblasti medicíny. Také se uplatňuje při sledování environmentálních kontaminantů a toxinů (tělní tekutiny potenciálně exponovaných osob).

U metody ELISA pro stanovení 8-oxodG je na destičce imobilizován modifikovaný antigen a pak se současně přidá primární protilátka vážící se na antigen a vzorek, který antigen v různé míře též obsahuje. Dojde ke kompetici – protilátka se buď váže na antigen na destičce, nebo na antigen ve vzorku. Jamky se pak promyjí a přidá se sekundární protilátka rozpoznávající primární protilátku vázanou na destičku. Pak následuje přidání substrátu.

4.3.1. Postup stanovení oxidačního poškození DNA metodou ELISA

Po inkubaci s S9 frakcí, popsané výše, byla DNA přečištěna. Vzorky obsahující CT-DNA s nebo bez S9 frakce byly smíchány se stejným objemem roztoku CI a centrifugovány 5 minut při 1800 x g. Horní fáze byla převedena do nové zkumavky a smíchána s dvěma objemy ledově studeného absolutního etanolu a 1/10 objemu 5 M NaCl. Vysrážená DNA byla odebrána pipetou do nové zkumavky, promyta v 70% etanolu, vakuově vysušena a uskladněna při teplotě -80°C do dalšího zpracování. Aby se zamezilo vzniku artefaktů při manipulaci s DNA, všechny roztoky byly doplněny o antioxidant, 0,1 mM deferoxamin mesylát (DFA).

Před samotným testem ELISA byly vzorky vyndány z mrazničky, rozpuštěny ve fosfátovém pufru (PBS), pH=7,4 obsahujícím 1 mM deferoxaminu mesylátu (PBS/DFA),

DNA byla fragmentována s použitím 22-G jehly a inkubována 5 minut při 100°C, aby došlo k denaturaci molekul. Koncentrace DNA byla upravena na 1 mg/ml pomocí PBS/DFA a vzorky byly poté použity pro test ELISA.

Hladiny 8-oxodG v DNA byly analyzovány pomocí kompetitivního testu ELISA. Jamky ELISA destičky (Corning Costar, kat.č. 3690, Half Area Plates) byly potaženy 5 ng 8-oxoG konjugovaného s hovězím sérovým albuminem (BSA; celkový objem 50 µl/jamka). Destičky byly sušeny přes noc při 37°C a poté byly promyty pufrům (PBS, 10% NaN₃, Tween 20) a blokovány 200 µl blokovacího pufru (1% fetální telecí sérum (FCS) v PBS/Tween; PBS/Tween – 0,05% Tween 20 v PBS) po 1 hodinu při pokojové teplotě. Po blokování byly přidány standardy 8-oxodG (koncentrace v rozmezí 5 – 80 ng/ml) a vzorky DNA (50 µl/jamka obsahující 50 µg DNA), následovalo přidání 50 µl primární protilátky (koncentrace 0,2 µg/ml, JaICA, Japonsko). Destičky byly inkubovány 1,5 hod. při pokojové teplotě.

Po inkubaci byly destičky znovu promyty pufrům (PBS, 10% NaN₃, Tween 20), bylo přidáno 100 µl sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (Sigma-Aldrich, kat.č. A4656) a destičky byly inkubovány další 1,5 hod. při pokojové teplotě. Po inkubaci byly destičky naposledy promyty pufrům a jednou 0,01 M dietanolaminem. Barva byla vyvinuta přidáním 100 µl p-nitrofenyl fosfátového substrátu (1 mg/ml v 1 mol/l dietanolaminu) do každé jamky a destičky byly inkubovány 30-60 minut při pokojové teplotě. Absorbance byla měřena při 405 nm. Každý vzorek byl analyzován v triplicátu. Byly vypočteny průměrné hodnoty 8-oxodG na 10⁵ guanosinových molekul a směrodatné odchylky a výsledky byly použity pro statistickou analýzu. (Rössner et al., 2007)

5. VÝSLEDKY

5.1. DNA adukty

V tabulce 2 jsou shrnuta základní data z odběrů aerosolů různé velikosti v lokalitách s různým stupněm zátěže.

V uvedených obdobích bylo odebráno 6 127 – 13 830 m³ vzduchu. Sezónní průměrné hmotnostní koncentrace částic PM₁₀ byly nejvyšší v lokalitě Březno (19,7 µg/m³), nižší v centru Prahy (14,5 µg/m³) a Dobrém Štěstí (13,3 µg/m³) a nejnižší hodnoty byly na pozad'ové stanici Láz (7,9 µg/m³). Z tabulky je patrný výrazně nižší obsah všech frakcí aerosolu na pozad'ové stanici Láz ve srovnání s ostatními lokalitami. Hmotnostní podíly se výrazně lišily mezi jednotlivými místy. Hrubá frakce (1-10 µm) byla nejvíce zastoupena v lokalitě Březno (55%), poté v lokalitě Praha (44%), zatímco v lokalitách Dobré Štěstí a Láz byly hodnoty nižší (27% a 36%). Jemná frakce (0,5-1 µm) a kondenzační frakce (0,17-0,5 µm) dominovaly v lokalitách Dobré Štěstí (48% a 25%) a Láz (43% a 22%), zatímco v lokalitách Březno a Praha byly jejich hodnoty nižší (35% a 10%; 38% a 18%). Koncentrace B[a]P a k-PAU v EOM jednotlivých frakcích ukazují, že jemná frakce 0,5-1 µm váže největší množství těchto látek ve všech studovaných lokalitách (graf 1), což je dáno hlavně vysokým hmotnostním podílem této frakce na celkovém množství PM (tab. 2).

B[a]P a k-PAU byly vázány na jemné a kondenzační frakce v podobném rozsahu s výjimkou lokality Březno, kde koncentrace B[a]P a k-PAU byly výrazně vyšší u kondenzační frakce (graf 2).

V lokalitě Březno a Dobré Štěstí byly podstatně vyšší koncentrace k-PAU (18 ng/m³ a 21 ng/m³), než tomu bylo u lokalit Praha a Láz (4 ng/m³ a 1 ng/m³). Poměry koncentrací jednotlivých k-PAU se výrazně nelišily mezi jednotlivými lokalitami a velikostními frakcemi (tab. 3).

Autoradiogramy získané analýzou DNA aduktů metodou ³²P-postlabeling (obr. 5) po 24 hodinové expozici DNA jednotlivým extraktům (100 µg EOM/ml) vykazují diagonální radioaktivní zóny (DRZ), které jsou typické pro indukci mnoha individuálních DNA aduktů komplexními směsmi genotoxických látek vázaných na prachové částice. DRZ vznikají na autoradiogramech překryvem velkého počtu stop (tzv. spotů) odpovídajících jednotlivým aduktům (viz. individuální adukty indukované samotným

B[a]P, použitým jako pozitivní kontrola – obr. 5E) a představují tak celkovou hladinu DNA aduktů indukovanou danou směsí látek, tj. jejich celkový genotoxický potenciál.

Organické extrakty z aerosolů různé velikosti odebrané v různých lokalitách indukovaly tvorbu DNA aduktů, a to jak v systému s metabolickou aktivací mikrozomálními enzymy, tak i bez aktivace. Právě k-PAU jsou nepřímo působící mutageny, které vyžadují pro svou genotoxicitu metabolickou aktivaci mikrozomálními enzymy. Z rozdílu intenzit DRZ mezi vzorky +S9 a –S9 (obr. 5) můžeme tedy usuzovat na výrazný podíl k-PAU na celkové genotoxicitě jednotlivých extraktů.

Celkové hladiny DNA aduktů indukované extrakty z aerosolů o různé velikosti vztažené na objem prosátého vzduchu jsou uvedeny v grafu 3. Výsledky naznačují hlavní podíl frakce (0,5-1 μm) na celkové genotoxicitě ve všech studovaných lokalitách, a to s i bez metabolické aktivace. Je patrný 5 – 6 násobný rozdíl mezi hladinami DNA aduktů u vzorků s a bez metabolické aktivace. Hladiny DNA aduktů vyjádřené na jednotku objemu prosátého vzduchu (m^3) jsou významné pro praktické srovnání možné genotoxicity pro člověka při inhalační expozici. Zatímco hladiny DNA aduktů vyjádřené jako hodnoty normované na jednotku hmotnosti zachyceného aerosolu (graf 4) ukazují, že nejúčinnějším nosičem genotoxických látek je kondenzační frakce (0,17-0,5 μm), a to zejména v lokalitách Březno a Praha centrum.

Byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace mezi koncentracemi B[a]P a k-PAU vázanými na částice aerosolu různé velikosti a celkovými hladinami DNA aduktů indukovaných jednotlivými EOM v acelulárním systému s DNA po aktivaci mikrozomálními enzymy (graf 5) ($R^2 = 0,98$ pro k-PAU, $R^2 = 0,97$ pro B[a]P).

5.2. Oxidační poškození

Hladiny 8-oxodG v acelulárním systému calf thymus DNA byly vyjádřeny dvěma způsoby. Nejprve byl modelován vliv znečištění ovzduší na lidský organismus, kdy byly hladiny 8-oxodG/ 10^5 dG normalizovány na 1000 m^3 prosátého vzduchu (8-oxodG/1000 m^3). Dále byl vyjádřen vztah mezi hmotnostní velikostí frakce PM a její schopností indukovat oxidační poškození DNA, kdy byly hladiny 8-oxodG/ 10^5 dG normalizovány na mikrogram PM (8-oxodG/ μg PM).

Výsledky v grafu 6 naznačují, že hladiny 8-oxodG/1000 m³ mají tendenci klesat s klesající koncentrací znečišťujících látek v ovzduší. Tento pokles byl významný jak pro vzorky s metabolickou aktivací, tak pro vzorky bez metabolické aktivace. Byly pozorovány výjimky: na pozadňové stanici Láz, která má nejnižší úroveň znečištění ovzduší, byly hladiny 8-oxodG/1000 m³ vyšší nebo srovnatelné s hladinami naměřenými v centru města. Po normalizaci hladin 8-oxodG na mikrogram PM již nebyla asociace s jednotlivými lokalitami pozorovatelná (graf 7).

Aerosoly menších velikostí jsou obecně považovány za více škodlivé pro lidské zdraví, protože pronikají hlouběji do plic. Na dalším obrázku (graf 8) je ukázán pozitivní vztah mezi hladinami 8-oxodG/μg PM a klesající velikostí PM. Nicméně tento trend byl významný pouze u vzorků bez metabolické aktivace. Z grafu 7 je zřejmé, že nejmenší velikost frakce (0,5-0,17 μm) indukovala nejvyšší oxidační poškození DNA/μg PM bez ohledu na metabolickou aktivaci.

Tabulka 4 ukazuje, že metabolická aktivace EOM, bez ohledu na velikost frakce, vedla ke zvýšení schopnosti PM indukovat oxidační poškození DNA. Dále byly provedeny korelační analýzy mezi hladinami 8-oxodG a koncentracemi k-PAU v EOM. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5 a na grafu 9. Tyto výsledky ukazují pozitivní korelace mezi hladinami 8-oxodG/1000 m³ a k-PAU s metabolickou aktivací vzorků i bez ní ($R = 0,70$; $p < 0,05$ a $R = 0,52$; $p = 0,08$). Pokud bylo poškození DNA vyjádřeno jako hladiny 8-oxodG/μg PM, žádný významný vztah nalezen nebyl ($R = -0,33$; $p = 0,30$ a $R = -0,27$; $p = 0,40$; pro vzorky s metabolickou aktivací a bez ní).

6. DISKUZE

Genetická toxikologie se zabývá hledáním vhodných modelů pro testování genotoxických účinků různých chemických látek v podmínkách *in vitro*, které by nejlépe modelovaly expozici těmto látkám *in vivo*. Avšak při hodnocení výsledků *in vitro* musíme brát v úvahu, že tyto modely nemusí zahrnout všechny procesy, které probíhají při *in vivo* expozici (např. absorpce, metabolismus atd.).

V této diplomové práci byl studován genotoxický potenciál EOM získané ve čtyřech lokalitách České republiky s různým stupněm znečištěného ovzduší. Ve všech těchto lokalitách byly odebrány 3 velikostní frakce aerosolu v rozsahu 0,17-10 μm . V diplomové práci byl použit acelulární *in vitro* test stanovení genotoxicity, který využíval analýzu DNA aduktů hodnocenou pomocí ^{32}P -postlabelingu a analýzu 8-oxodG hodnocenou pomocí testu kompetitivní ELISA. Nativní CT-DNA byla inkubována s organickými extrakty z PM za podmínek s a bez metabolické aktivace. Tento model předpokládal, že genotoxické látky adsorbované na aerosoly jsou v plicích z povrchu částic uvolněny. Dřívější studie prokázaly (Gerde et al., 2001; 1991), že téměř 80% vysoce lipofilních karcinogenů, jako je B[a]P, je uloženo v alveolární oblasti plic. Poté jsou odsud transportovány do krevního oběhu, aniž by byly metabolizovány, zatímco asi 20% je uloženo v oblasti dýchacích cest a je zvolna absorbováno a metabolizováno na látky reagující s DNA. Použitá extrakce k-PAU z aerosolů pomocí dichlormetanu, využívaná v této diplomové práci, je rozhodně účinnější než desorpce v plicích *in vivo*. Vzhledem k uvedenému je ale zřejmé, že většina k-PAU je rychle desorbována po depozici částic PM v plicích.

6.1. DNA adukty

Po porovnání hmotnosti PM v jednotlivých velikostních frakcích bylo zjištěno, že hrubá frakce 1-10 μm převažovala v lokalitě Březno (55%), zatímco jemné částice (< 1 μm) související s dopravou převažovaly v lokalitě Dobré Štěstí (73%). Organické extrakty z PM obsahují ~ 0,1% (w/w) k-PAU nebo méně. Nedávné studie (Binková et al., 2007; Sevastyanova et al., 2008) ukázaly, že tvorba DNA aduktů závisí především na obsahu k-PAU a analýza PM_{2,5} nebo PM₁₀ nepokrývá možná karcinogení rizika, vyplývající ze znečištěného okolního vzduchu. Nejprve byly analyzovány hladiny k-PAU ve všech

extraktech. V této analýze nebyly zjištěny výrazné rozdíly mezi relativním výskytem jednotlivých k-PAU mezi lokalitami a velikostními frakcemi částic. Rozdíly byly v rozmezí 2-4%, což nám neumožnilo určit zdroje PAU na základě poměrů jednotlivých PAU ($B[ghi]Pe / B[a]P$, $I[cd]Py / I[cd]Py + B[ghi]Pe$ nebo $B[a] / B[a] + Chry$) (Mantis et al., 2005). Určení zdrojů PAU by vyžadovalo podrobnější chemické a velikostní analýzy částic. Hlavním výsledkem je tedy zjištění, že genotoxický potenciál prachových částic v ovzduší závisí na velikosti těchto částic a je významně vyšší pro jemnější částice (0,5-1 μm). Toto zjištění pravděpodobně souvisí s vyšším měrným povrchem jemnějších částic, a tím i kapacitou adsorbovat na povrchu genotoxické látky typu k-PAU.

Kondenzační frakce aerosolu (0,17-0,5 μm) jsou také velmi účinné nosiče k-PAU, ale podíl jejich hmotnosti na celkové hmotnosti PM je relativně nízký ve srovnání s jemnou frakcí. Také příspěvek kondenzační frakce k celkovým hladinám DNA aduktů na m^3 je nižší. Nicméně úroveň DNA aduktů normalizované na hmotnost aerosolu v jednotlivých frakcích ukazují, že kondenzační frakce se podílí na celkové genotoxicitě více, než tomu odpovídá jejich hmotnost.

Vysoce významná korelace mezi koncentracemi B[a]P a k-PAU vázanými na aerosoly a celkovými hladinami DNA aduktů, které jsou několikanásobně vyšší s metabolickou aktivací, naznačuje, že obsah k-PAU je významným faktorem genotoxického potenciálu extraktů.

Hladiny DNA aduktů indukované bez metabolické aktivace byly čtyř- až šestinásobně nižší, přesto byla zjištěna významná indukce DNA aduktů ve všech vzorcích EOM. Tento fakt naznačuje, že aerosoly z různých lokalit a jejich frakce obsahují určité množství genotoxických látek, které nevyžadují aktivaci mikrozomálními enzymy. Genotoxické účinky organických rozpustných extraktů mohou být vyvolány i jinými sloučeninami než k-PAU, pravděpodobně dusíkatými nebo hydroxylovými deriváty PAU. Ve studii Claxton et al. (2004) byla zkoumána mutagenita, která byla spojována s mírně polárními/vysoce polárními třídami sloučenin, obsahujícími nitroaromatické sloučeniny, aromatické aminy a aromatické ketony. Studie zabývající se smogem ukázaly, že mutagenní alifatické a aromatické dusíkaté sloučeniny jsou produkovány v atmosféře, když jsou organické sloučeniny (i nemutagenní) vystaveny oxidům dusíku a slunečnímu záření. Reakce probíhající v atmosféře proto mohou mít velký vliv na genotoxickou zátěž obyvatelstva.

Opakovaně bylo prokázáno, že nitro-PAU přítomné v mnohem nižších koncentracích než k-PAU ve vnějším ovzduší (Topinka et al., 2000), jsou mnohem více genotoxické než k-PAU a jejich příspěvek k celkovému genotoxickému potenciálu EOM může být významný.

Na závěr můžeme říci, že modelový systém, použitý v diplomové práci, na základě analýzy celkových DNA aduktů indukovaných v acelulárním testu s a bez metabolické aktivace mikrozomálními enzymy cytochromu P450, představuje poměrně jednoduchý způsob posouzení a porovnání genotoxického potenciálu různých komplexních směsí obsahujících přímo i nepřímo působící genotoxické sloučeniny. Kromě toho tento modelový systém umožňuje studium alternativních metabolických drah PAU a dalších komponent, které mohou vést k tvorbě semichinonů a chinonů (Park et al., 2005), které jsou známy indukcí oxidačního poškození DNA, tvorbou ROS a zvýšením hladin 8-oxodG. Spektrum DNA aduktů a tvorba ROS mohou být vysvětlením, proč některé PAU působí jako kompletní karcinogeny (Penning et al., 2002). Použitý acelulární modelový systém nemůže samozřejmě nahradit molekulárně epidemiologické studie prováděné na populacích silně exponované znečištěnému prostředí. Mohl by ale být použit jako screeningová metoda k identifikaci a charakterizaci lokalit se zvýšeným rizikem expozice genotoxickým látkám v komplexních směsích přítomných v ovzduší.

6.2. Oxidační poškození

Při hodnocení oxidačního poškození DNA byly využity dva přístupy. Nejprve byly výsledky hladin 8-oxodG normalizovány na 1000 m³ prosátého vzduchu. Tento typ analýzy je významný, neboť určuje aktuální toxicitu vzduchu v průběhu inhalační expozice. Poté byly koncentrace 8-oxodG normalizovány na mikrogram PM ve vzduchu, což umožnilo vyhodnotit velikostní frakci PM, která byla největším induktorem oxidačního poškození DNA.

Oxidační poškození indukované PM bylo zkoumáno v mnoha studiích. Tyto studie se liší ve zdroji PM, použitými metodami extrakce PM a metodami detekce oxidačního poškození. Vodní extrakce nebo ultrazvuk jsou využívány při analýze efektu přechodných kovů. Mnoho autorů uvádí, že ve vodě rozpustné frakce indukují hydroxylové radikály, tvořené cestou Fentonovy reakce s peroxidem vodíku (Cho et al., 2005; Danielsen et al., 2008; Dellinger et al., 2001; Knaapen et al., 2002; Valavanidis et al., 2005). Nicméně bylo

také ukázáno, že PM způsobuje oxidační poškození organismu díky přítomnosti semichinonových radikálů, které jsou v plicích stabilní po dobu několika měsíců. Tam se účastní redoxních cyklů, při kterých se vytvářejí ROS, které indukují oxidační stres (Squadrito et al., 2001).

Při hodnocení oxidačního poškození byl pozorován pokles oxidační kapacity EOM při působení na DNA s klesající koncentrací k-PAU navázaných na PM. Avšak PM získané z pozadové stanice Láz indukovaly vyšší hladiny 8-oxodG než vzorky z centra Prahy, ačkoli zde byla koncentrace PM vyšší než na pozadové stanici. Bylo zajímavé, že vztah mezi oxidačním poškozením DNA a lokalitou byl pozorován jen tehdy, když byly výsledky normalizovány na 1000 m³ vzduchu. Když byly normalizovány na mikrogram PM, žádná asociace mezi hladinami 8-oxodG a lokalitou nebyla zjištěna. Tento fakt může souviset s rozdílnou distribucí velikostních frakcí PM v jednotlivých lokalitách. Zatímco PM shromážděné v lokalitě Březno obsahovaly jen asi 10% kondenzační frakce (0,17-0,5 μm) a 35% jemné frakce (0,5-1 μm), na pozadové stanici Láz bylo procentuální zastoupení těchto frakcí 22% a 43%.

Výsledky hodnocení hladin 8-oxodG tedy naznačují, že menší frakce jsou silnějšími induktory oxidačního poškození DNA. Tyto výsledky jsou ve shodě i s jinými studiemi (Healey et al., 2005; Cho et al., 2005), v nichž ale byly použity extrakty PM rozpustné ve vodě. Jiné studie (de Kok et al., 2005; Healey et al., 2005) používaly organické extrakty PM v acelulárním CT-DNA systému, avšak pouze jedna z nich (de Kok et al., 2005) testovala S9 metabolickou aktivaci extraktů. Žádná z těchto studií neanalyzovala oxidační kapacitu jednotlivých velikostních frakcí.

Výsledky hodnocení oxidačního poškození DNA uvedené v této diplomové práci tedy ukazují, že schopnost organických extraktů PM indukovat oxidační poškození DNA se zvyšuje se snižující se velikostí částic. Tento trend je méně výrazný po metabolické aktivaci EOM. Přítomnost PAU v EOM tak zřejmě není jediným faktorem zodpovědným za oxidační poškození indukované organickými extrakty. Z výsledků též vyplývá, že metabolická aktivace PAU hraje alespoň částečnou roli v indukci oxidačního poškození DNA, neboť hladiny 8-oxodG v CT-DNA inkubované s metabolickou frakcí byly výrazně vyšší než u vzorků bez metabolické aktivace. Byla též pozorována pozitivní korelace mezi koncentracemi k-PAU a hladinami 8-oxodG indukovanými PM. Korelace byla výraznější, když byly extrakty PM inkubovány s S9 metabolickou frakcí. Tyto výsledky se liší od

studie de Kok et al. (2005), kde S9 metabolická aktivace způsobila naopak pokles hladin 8-oxodG, které byly indukované PM.

7. ZÁVĚR

Modelový systém založený na analýze DNA aduktů indukovaných v acelulárním testu s a bez metabolické aktivace mikrozomálními enzymy, použitý v této diplomové práci, představuje jednoduchou metodu pro hodnocení a porovnání genotoxických potenciálů různých komplexních směsí obsahujících přímo i nepřímo působící genotoxické sloučeniny. Tento systém umožňuje také studovat alternativní dráhy metabolismu k-PAU a dalších komponent, které mohou vést k tvorbě semichinonů a chinonů, které se podílejí na oxidačním poškození DNA indukcí reaktivních forem kyslíku a na zvýšení hladin 8-oxodG. Tento acelulární model nemůže nahradit molekulárně epidemiologické studie prováděné na populacích, které jsou vystaveny znečištěnému životnímu prostředí. Mohl by být ale použit jako screeningová metoda k identifikaci a charakterizaci lokalit se zvýšeným rizikem expozice populace genotoxickým sloučeninám. Nejdůležitější poznatky této práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- 1) Organické extrakty z aerosolů různé velikosti odebrané v různých lokalitách indukují tvorbu DNA aduktů, a to jak v systému s metabolickou aktivací, tak i bez aktivace.
- 2) Jemná frakce 0,5-1 μm váže největší množství k-PAU ve všech studovaných lokalitách, což je dáno hlavně vysokým hmotnostním podílem této frakce na celkovém množství PM.
- 3) Vysoký stupeň korelace mezi obsahem k-PAU v extraktech z PM a úrovní genotoxicity, kterou tyto extrakty indukují, ukazuje, že k-PAU jsou hlavní genotoxickou složkou komplexních směsí látek vázaných na PM.
- 4) Genotoxický potenciál aerosolů závisí na jejich velikosti a je významně vyšší pro částice pod 1 μm . Frakce 0,5-1 μm měla hlavní podíl na celkové genotoxicitě ve všech studovaných lokalitách, a to jak s, tak bez metabolické aktivace. Toto zjištění pravděpodobně souvisí s vyšším měrným povrchem jemnějších částic, a tím i kapacitou adsorbovat na povrchu genotoxické látky typu k-PAU.
- 5) Nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi relativním zastoupením jednotlivých k-PAU mezi lokalitami a velikostními frakcemi.

- 6) Organické extrakty z PM jsou schopné indukovat oxidační poškození DNA v acelulárním CT-DNA systému.
- 7) Oxidační kapacita PM extraktů se zvyšuje s rostoucí úrovní znečištění ovzduší.
- 8) Menší velikost frakce PM indukuje vyšší oxidační poškození DNA, které je způsobeno částečně vyšším obsahem k-PAU a částečně jinými neidentifikovanými faktory.

8. SEZNAM ZKRATEK

15-F2t-IsoP	15-F2t-isoprostan
8-OhdG	8-hydroxydeoxyguanosinu
8-oxodG	8-oxodeoxyguanosin
^{99m} Tc	metastabilní nukleární izomer technecium-99m
9-OH-B[a]P	9-hydroxy-benzo[a]pyren
A549	buňky lidského alveolárního adenokarcinomu
AHH	hydroxyláza aromatických uhlovodíků (z angl. Arylhydrocarbon Hydroxylase)
ATP	adenosin-5'-trifosfát
B[a]A	benz[a]antracen
B[a]P	benzo[a]pyren
B[b]Flu	benzo[b]fluoranten
B[ghi]P	benzo[ghi]perylen
B[k]Flu	benzo[k]fluoranten
BP	benzo[a]pyren
BPDHD	BP-7,8-dihydrodiol
BSA	hovězí sérový albumin
C57BL/6	inbrední kmen laboratorních myší
CI	chloroform:izoamylalkohol
CI/mmol	curie/mmol jednotka aktivity ATP
CIP	chloroform:isoamylalkohol:fenol
CO	oxid uhelnatý
CT	telecí brzlík (z angl. Calf Thymus)
CYP1A1	protein cytochromu P450, u lidí je kódovaný genem CYP1A1
CYP1B1	protein cytochromu P450, u lidí je kódovaný genem CYP1B1
D[ah]A	dibenz[ah]antracen
D1-D5	směry v TLC chromatografii
DB[a,l]P	dibenzo[a,l]pyren
DB[a,h]A	dibenz[a,h]anthracen
DB[a,h]AC	dibenz[a,h]acridin
DB[a,l]P	dibenzo[a,l]pyren

DFA	deferoxamin mesylát
DMBA	dimethylbenz[a]anthracen
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRZ	diagonální radioaktivní zóna
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay, biochemická technika používaná hlavně v imunologii k odhalení přítomnosti protilátky nebo antigenu ve vzorku
EOM	extrahovatelné organické extrakty (z angl. Extractable Organic Matter)
ESP	elektron-spinová resonance
FCS	fetální telecí sérum
GSTM1	polymorfismus genu kódujícího glutathion S-transferázu M1
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HEL	buněčná linie diploidních lidských fibroblastů
HepG2	jaterní buněčná linie lidského hepatomu
HiVol	velkoobjemový kaskádní impaktor (z angl. High Volume air sampler)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
CHEST	test pro určení embryotoxicity (z angl. Chick Embryotoxicity Screening Test)
Chry	chrysen
I[cd]P	ideno[123cd]pyren
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. International Agency for Research on Cancer)
IUGR	nitroděložní růstové retardace plodu (z angl. Intrauterine Growth Restriction)
k-PAU	karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky
LC-MS/MS	metoda kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie
M1dG	malondialdehyd-2'-deoxyguanosin
MDA	malondialdehyd
MN	mikrokolální nukleáza

NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAT2	polymorfismus genu kódujícího N-acetyl transferázu 2
NCI-H322	lidská plicní nádorová linie
NT	3-nitrotyrosin
OR	počátek v chromatografii (z angl. Origin)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr
PM	prachové částice (z angl. Particulate Matter)
PM ₁₀	prašný aerosol o střední hodnotě aerodynamického průměru menším než 10 µm
PM _{2,5}	prašný aerosol o střední hodnotě aerodynamického průměru menším než 2,5 µm.
PUF	polyuretanová pěna (a angl. Polyurethane Foam)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
S9	jaterní mikrosomální frakce
SCGE	kometový test (z angl. single cell gel electrophoresis)
SPD	fosfodiesteráza
TA98	bakteriální kmen Salmonella typhimurium
TCDD	2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin
THP-1	buněčná linie lidské monocytární leukémie
TLC	vícerozměrná tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin-layer chromatography)
Tris	tris[hydroxymethyl]aminomethan
Tween 20	polyoxyelthylen sorbitan monolaurát
U/ml	počet jednotek/ml
V79NH	modifikovaná linie plicních buněk čínského křečka
VOC	volatilní organické látky (z angl. Volatile Organic Compounds)
WB-F344	jaterní buněčná linie potkana
YG1041	bakteriální kmen Salmonella typhimurium

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adamec, V. (2004): Analýza toxických a genotoxických účinků reálných směsí emitovaných z dopravy. Centrum dopravního výzkumu, Brno

Beneš, I., Skorkovský, J. (2005): Znečištění ovzduší v Praze, Teplicích a Prachaticích v posledních 5 letech. *Ochrana ovzduší* 5-6: 10-13

Binková, B., (1993): Poškození DNA vnějšími vlivy: biomonitorování a analýza aduktů. *Chem. Listy* 87: 564 – 574

Binková, B., Leníček, J., Beneš, I., Vidová, P., Gajdoš, O. Fried, M., Šrám, R.J. (1998a): Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in in vitro acellular assays coupled with ³²P-postlabelling and HPLC analysis of DNA adducts. *Mutat. Res.* 414: 77 – 94

Binková, B., Topinka, J., Jelínek, R., Šrám, R.J. (1998b): Hodnocení genotoxicity a embryotoxicity ovzduší. V: Šrám R. (ed.): *Program Teplice II – Výsledky 1997*. ČEÚ, Praha, 42 – 50

Binková, B., Veselý, D., Veselá, D., Jelínek, R., Šrám, R.J. (1999): Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat. Res.* 440: 45 – 58

Binková, B., Černá, M., Pastorková, A., Jelínek, R., Beneš, I., Novák, J., Šrám, R.J. (2003): Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutat. Res.* 525: 43 – 59

Binková, B., Šrám, R.J. (2004): The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat. Res.* 547: 109 – 121

Binková, B., Topinka, J., Šrám, R.J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Schmuczerová, J., Kalina, I., Popov, T., Farmer, P.B. (2007): In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles Part I: Acellular assay. *Mutat. Res.* 620 (1-2): 114 – 122

Bláha, L., Kapplová, P., Vondráček, J., Upham, B., Machala, M. (2002): Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Sci.* 65: 43 – 51

Bonetta, S.A., Gianotti, V., Bonetta, S., Gosetti, F., Oddone, M., Gennaro, M.C. a Carraro, E. (2009): DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM2.5 from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 77 (7): 1030 – 1034

Burczynski, M.E., Penning, T.M. (2000): Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer. Res.* 60: 908 – 915

Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H. (2004): The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: salmonella mutagenicity. *Mutat. Res.* 567: 347 – 399

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17: 1195 – 1214

Costa, C., Catania, S., De Pasquale, R., Stancanelli, R., Scribano, G.M. a Melchini, A. (2010): Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: Role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology* 271 (3): 83 – 86

Courter, L.A., Pereira, C. a Baird, W.M. (2007): Diesel exhaust influences carcinogenic PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture. *Mutat. Res.* 625 (1-2): 72 – 82

Crebelli, R., Tomei, F., Zijno, A., Ghittori, S., Imbriani, M., Gamberale, D., Martini A. and Carere A. (2001): Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological

monitoring of traffic police in Rome. *Occup. Environ. Med.* 58: 165 – 171

ČHMÚ: http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/tab_roc_CZ.html
20.5.2011

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329: 23 – 38

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2006): Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell Mol. Med.* 10: 389 – 406

Danielsen, P.H., Loft, S., Moller, P. (2008): DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles. *Part. Fibre Toxicol.* 5: 6

De Kok, T.M., Hogervorst, J.G., Briede, J.J., van Herwijnen, M.H., Maas, L.M., Moonen, E.J., Drieste, H.A., Kleinjans, J.C. (2005): Genotoxicity and physicochemical characteristics of traffic-related ambient particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen* 46: 71 – 80

Dejmek, J., Selevan, S.G., Beneš, I., Solanský, I., Šrám, R.J. (1999): Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 107: 475 – 480

Delfino, R.J. (2002): Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research. *Environ. Health Perspect.* 110: 573 – 589

Dellinger, B., Pryor, W.A., Cueto, R., Squadrito, G.L., Hegde, V., Deutsch, W.A. (2001): Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 1371 – 1377

Dipple, A. (1995): DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16: 437 – 441

Dockery, D.W., Pope, C.A., XU, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Speizer, F.E. (1993): An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329: 1753 – 1759

EPA Report, Methods for Determination of Toxic Organic compounds in Ambient air. No 600/4-84-041, US EPA, RTP, NC, 1984

EPA Report, Compendium of Methods for Toxic Organic compounds in Ambient air, Compendium method TO-13A. No. 625/R-96/010b, US EPA, OH, 1999.

Fujitani, Y., Hirano, S. (2008): Health effects of nanoparticles and nanomaterials (II) methods for measurement of nanoparticles and their presence in the air. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 63(3): 663 - 9

Gábelová, A., Valovičová, Z., Lábaj, J., Bačová, G., Binková, B., Farmer, B. (2007): Assessment of oxidative DNA damage formation by organic complex mixtures from airborne particles PM₁₀. *Mutat. Res.* 620 (1-2): 135 – 144

Gerde, P., M.A. Medinsky and J.A. Bond (1991): The Retention of Polycyclic Aromatic hydrocarbons in the Bronchial Airways and in the Alveolar Region-A Theoretical Comparison. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 107: 239-252

Gerde, P., Muggenburg, B.A., Lundborg, M., Dahl, A.R. (2001): The rapid alveolar adsorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis* 22: 741 – 749

Ghio, A.J., Stonehuerner, J., Dailey, L.A., Carter, J.D. (1999): Metals associated with both the water soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particles catalyze an oxidative stress. *Inhal. Toxicol.* 11: 37 – 49

Gupta, R.C., Reddy, M.V., Randerath, K. (1982): 32P-postlabeling analysis of non-

radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 3: 1081 – 1092

Gupta, R.C. (1985): Enhanced sensitivity of ³²P-postlabelling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer. Res.* 45: 5656 – 5662

Gupta, R.C., Earley, K. (1988): ³²P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis* 9: 1687 – 1693

Hanzalová, K., Rössner Jr., P., Šrám, R.J. (2010): Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutat. Res.*, 696: 114 – 121

Harris, C.C. (1991): Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.*, 51: 5023 – 5044

Healey, K., Lingard, J.J., Tomlin, A.S., Hughes, A., White, K.L., Wild, C.P., Routledge, M.N. (2005): Genotoxicity of size-fractionated samples of urban particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen* 45: 380 – 387

Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D.E.G., Kadlubar, F.F., Segerbäck, D., Bartsch, H. (1994): DNA Adducts: Identification and Biological Significance. IARC, Lyon

Holoubek, I., (1996): Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí. ČEÚ a Odbor ekologických rizik a monitoringu MŽP ČR, Praha

Cho, A.K., Sioutas, C., Miguel, A.H., Kumagai, Y., Schmitz, D.A., Singh, M., Eiguen-Fernandez, A., Froines, J.R. (2005): Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles. *Basin. Environ. Res.* 99: 40 – 47

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983): Polynuclear Aromatic Compounds. Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data. WHO, Lyon

IARC (1984): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic risk of Chemicals to Humans, Vol. 34, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 3. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

IARC (1987): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic risk of Chemicals to Humans, Suppl. 7, overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Vol. 1-42. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, 20.6.2011

Karlsson, H.L., Nygren, J., Moller, L. (2004): Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat.Res.* 565: 1 – 10

Khalili, H., Zhang, F.J., Harvey, R.G., Dipple, A. (2000): Mutagenicity of benzo[a]pyrene-deoxyadenosine adducts in a sequence context derived from the p53 gene. *Mutat. Res.* 465: 39 – 44

Klauning, J.E., Kamendulis, L.M. (2004): The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 239 – 267

Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J., Schins, Roel P.F. (2002): Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234/235: 317 – 326

Leavitt, S.A., George, M.H., Moore T., Ross, J.A. (2008): Mutations induced by benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene in lacI transgenic B6C3F1 mouse lung result from stable DNA adducts. *Mutagenesis* 23(6): 445 – 50

Leníček, J., Pochmanová, D., Sekyra, M., Bednářková, K., Beneš, I. (1998): Genotoxicita atmosférických polutantů: Biologicky řízená frakcionace organických látek vázaných na polétavou prašnost. V: Šrám, R. (ed.): *Program Teplice II – Výsledky 1997*. ČEÚ, Praha,

Lewtas, J., Lewis, C., Zweidinger, R., Stevens, R., Cupitt, L. (1992): Sources of genotoxicity and cancer risk in ambient air. *Pharmacogenetics* 2: 288 – 296

Lewtas, J. (2007): Air pollution combustion emissions: characterisation of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive and cardiovascular effects. *Mutat.Res.* 636: 95 – 133

Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass R.N., Bruinink, A., Stark W.J. (2007): Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.* 41(11): 3791 – 2

Lin, T. a Yang, M.S. (2007): Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG₂ cells. *Toxicology* 235 (1-2): 1- 10

Mahadevan, B., Luch, A., Bravo, C.F., Atkin, J., Steppan, L.B., Pereira, C., Kerkvliet, N.I. and Baird, W.M. (2005): Dibenzo[a,l]pyrene induced DNA adduct formation in lung tissue in vivo. *Cancer Letters* 227 (1): 25 – 32

Mantis, J., Chaloulakou, A, Samara, C. (2005): PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the greater area of Athens, Greece. *Chemosphere* 59: 593 – 604

Mersch-Sundermann, V., Mochayed, S., Kevekordes, S. (1992): Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in Escherichia coli PQ3. *Mutat. Res.* 278: 1 –9

Motuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J. (2004): Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18: 1791 – 1800

Murray, R.K. Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2003): Harper's Biochemistry. 26. vydání, Appleton & Lange, Connecticut

Nemmar, A., Hoet, P.H.M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B. (2002): Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation* 105: 411 – 414

Nesnow, S., Ross, J.A., Mass, M.J., Stoner, G.D. (1998b): Mechanistic relationship between DNA adducts, oncogene mutations, and lung tumorigenesis in strain A mice. *Exp.Lung Res.*, 24: 395 – 405

Oh, S.M., Park, Y.R., Kim, H.R., Park, Y.J., Kim, M.J., Son, B.H., Lee, M.J, Lee, S.Y. A Chung K.H. (2011): Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat. Res.* 723(2): 142 - 151

Park, J.H., Gopishetty, S., Szewczuk, L.M., Troxel, A.B., Harvey, R.G., Penning, T.M. (2005): Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH o-quinones: involvement of reactive oxygen species and copper (II)/copper (I) redox cycling. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 1026 – 1037

Park, J.H., Troxel, A.B., Harvey, R.G., Penning, T.M. (2006): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 719 – 728

Penning, T.M., Palackal, N.T., Blair, I.A., Harvey, R.G. (2002): The aldo-keto reductases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation. *Polycyclic Aromat. Compd.* 22: 791 – 800

Phillips, D.H. (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443: 139 – 147

Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D. (2002): Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287: 1132 – 1141

Prahalad, A.K., Inmon, J., Dailey, L.A., Madden, M.C., Ghio, A.J., Gallagher, J.E. (2001): Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 879 – 887

Pratico, D., Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A. (2001): The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol. Metab.* 12: 243 –247

Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C. (1981): 32P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6126 – 6129

Reddy, M.V., Randerath, K. (1986): Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7: 1543 – 1551

Roberts, L.J., Morrow, J.D. (2000): Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biol. Med.* 28: 505 – 513

Rössner Jr., P., Švecová, V., Milcová, A., Lněničková, Z., Solanský, I., Santella, R.M., Šrám, R.J. (2007): Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat. Res.* 617: 23 – 32

Rössner Jr., P., Švecová, V., Milcová, A., Lněničková, Z., Solanský, I., Šrám, R.J. (2008): Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers Part I. Oxidative damage to DNA. *Mutat. Res.* 642: 14 – 20

Rössner Jr., P., Švecová, V., Topinka, J., Šrám, R.J. (2009): Oxidační poškození u osob žijících v Praze a na Ostravsku. *Ochrana ovzduší* 5-6: 32 – 36

Rössner Jr., P., Švecová, V., Šrám, R.J. (2010): Vliv znečištěného ovzduší na hladiny markerů oxidačního poškození makromolekul. *Ochrana ovzduší* 5-6: 38 – 43

Salnikov, V., Lukyánenko, Y.O, Frederick, C.A., Lederer, W.J., Lukyánenko, V.(2007): Probing the Outer Mitochondrial Membrane in Cardiac Mitochondria with Nanoparticles.

Samet, J.M., Dominici, F., Curriero, F.C., Coursac, I., Zeger, S.L. (2000): Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N. Engl. J. Med.* 343: 1742 – 1749

Scandalios, J.G. (2002): Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol.* 3, s. REVIEWS1019

Sevastyanova, O., Binková, B., Topinka, J., Šrám, R.J., Kalina, I., Topov, T., Nováková, Z., Farmer, P.B. (2007): In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles Part II: Human cell lines. *Mutat. Res.* 620 (1-2): 123 – 134

Sevastyanova, O., Nováková, Z., Hanzalová, K., Binková, B., Šrám, R.J., Topinka, J. (2008): Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat. Res.* 649: 179 – 186

Scherer, G. (2005): Biomonitoring of inhaled complex mixtures-ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57: 75 – 110

Singh, R., Kaur, B., Kalina, I., Popov, T.A., Georgieva, T., Garte, S., Binková, B., Šrám, R.J., Taioli, E., Farmer, P.B. (2007): Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 620: 71 – 82

Singh, R., Šrám, R.J., Binková, B., Kalina, I., Popov, T.A., Georgieva, T., Garte, S., Taioli, E., Farmer, P.B. (2007): The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat. Res.* 620: 83 – 92

Squadrito, G.L., Cueto, R., Dellinger, B. and Pryor, W.A. (2001): Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radical Biology & Medicine* 31(9): 1132 – 1138

Stiborová, M., Frei, E., Bieler, C. A., Schmeiser, H.H. (1998): 32P-Postlabelling: A sensitive technique for the detection of DNA adducts. *Chem. Listy* 92: 661 – 668

Stone, V., Johnston, H., Clift, M.J. (2007): Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience* 6(4): 331 – 340

Sugita, K., Goto, S., Endo, O., Nakajima, D., Yajima, H., Ishii, T. (2004): Particle size effects on the deposition ratios of airborne particles in the respiratory tract. *J.Health Sci.* 50: 185 – 188

Šrám, R.J., Beneš, I., Binková, B., Dejmek, J., Horstman, D., Kotěšovec, F., Otto, D., Perreault, S.D., Rubeš, J., Selevan, S.H., Skalík, I., Stevens, R.K., Lewtas, J. (1996): Teplice program - the impact of air pollution on human health. *Environ. Health Perspect.*, 104: 699 – 714

Šrám, R.J., Binková, B., Rössner, P., Rubeš, J., Topinka, J., Dejmek, J. (1999): Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutat. Res.*, 428: 203 – 215

Tomaniová, M., Kocourek, V., Hajšlová, J. (1997): Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chem. Listy* 91: 357 – 366

Topinka, J., Binková, B., Mračková, G., Stávková, Z., Peterka, V., Beneš, I., Dejmek, J., Leníček, J., Pilčík, T., Šrám, R.J. (1997): Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. *Environ. Mol. Mutagen.* 30: 184 – 195

Topinka, J., Schwarz, L.R., Kiefer, F., Wiebel, F.J., Gakdoš, O., Vidová, P., Dobiáš, L., Fried, M., Šrám, R.J., Wolff, T. (1998): DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract. *Mutat. Res.* 419: 91 – 105

Topinka, J., Schwarz, L.R., Wiebel, F.J., Černá, M., Woff, T. (2000): Genotoxicity of urban air pollution in the Czech Republic Part II: DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat.Res.* 469: 83 – 93

Topinka, J., Binková, B., Chvátalová, I., Lněničková, I., Milcová, A., Sevastyanova, O., Solanský, I., Nováková, Z., Šrám, R.J. (2005a): Možnosti využití DNA aduktů jako biomarkeru expozice karcinogenům v ovzduší: Studie na městských strážnících v Praze. *Ochrana ovzduší* 5-6: 26-31

Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krčmář, P., Pěnčíková, A. and Machala, M. (2008): DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 638(1-2): 122 – 132

Topinka, J., Uhlířová, K., Líbalová, H., Milcová, A., Schmuczerová, J., Velemínský, M., Šrám, R.J. (2010): Genotoxicita a změny genové exprese indukované prachovými částicemi v lidských buněčných liniích. *Ochrana ovzduší* 5-6: 8 – 13

Valavanidis, A., Vlahoyianni, T., Fiotakis, K. (2005): Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OhdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radical Res.* 39: 1071 – 1081

White, P.A. (2002): The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat. Res.* 515: 85 – 98

Whong, W.Z., Stewart, J.D., Ong, T. (1992): Comparison of DNA adduct detection between two enhancement methods of the ³²P-postlabelling assay in rat lung cells. *Mutat. Res.* 283: 1 – 6

Whong, W.Z., Stewart, J.D., Cutler, D. and Ong, T. (1994): Induction of in vivo DNA adducts by 4 industrial by-products in the rat-lung-cell system. *Mutat. Res.* 312 (2): 165 – 172

Wolterbeek, A.P., Roggenband, R., Steenwinkel, M.J., Baan, R.A., Rutten, A.A. (1993): Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by ³²P-postlabelling analysis and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis* 14: 463 – 467

<http://hplc1.sweb.cz/Kontaminant/pah.htm> 22.5.2011

http://old.chmi.cz/uoco/prj/vav_740_3_02/dp1dod.pdf 22.5.2011

10. PŘÍLOHY: TABULKY

Stanice	PM ₁₀ µg/m ³	PM _{2,5} µg/m ³	B[a]P ng/m ³
Ostrava-Poruba	34,0 ± 28,5	27,6 ± 21,1	3,3 ± 1,0
Ostrava-Bartovice	47,6 ± 42,1	35,1 ± 29,0	9,2 ± 4,2
Karviná	44,7 ± 36,8	x	7,4 ± 2,0
Havířov	43,9 ± 35,9	x	x
Praha-Smíchov	30,5 ± 25,1	22,1 ± 18,4	0,9 ± 0,4
Praha-Libuš	25,4 ± 21,9	18,7 ± 15,9	0,8 ± 0,4
České Budějovice	23,0 ± 17,2	17,4 ± 14,5	1,4 ± 0,5

x – není měřeno

Tab. 1: Znečištění ovzduší ve vybraných lokalitách ČR v r. 2009 (dle ČHMÚ).

Lokalita	Období odběru	Objem vzduchu (m ³)	Velikost frakcí (µm)	PM (µg/m ³)	Hm.podíl (%)
Březno (povrchový důl)	5.2. - 9.2.2009	6127	1 - 10	10,9	55,3
			0,5 - 1	6,9	35,1
			0,17 - 0,5	1,9	9,6
Dobré Štěstí (dálnice)	13.2. - 19.2.2009	10 121	1 - 10	3,5	26,6
			0,5 - 1	6,4	48
			0,17 - 0,5	3,4	25,4
Praha centrum	4.3. - 14.3.2009	13 830	1 - 10	6,4	44,4
			0,5 - 1	5,5	37,9
			0,17 - 0,5	2,6	17,7
Láz (požadová stanice)	18.3. - 26.3.2009	12 542	1 - 10	2,8	35,6
			0,5 - 1	3,4	42,9
			0,17 - 0,5	1,7	21,5

Tab. 2: Základní charakteristiky vzorků aerosolů různé velikosti odebraných v různých lokalitách ČR.

k-PAU	Relativní zastoupení celkové hmotnosti k-PAU [%]											
	Březno			Dobré Štěpí			Praha centrum			Láz		
	1-10 ^a	0,5-1 ^a	0,17-0,5 ^a	1-10 ^a	0,5-1 ^a	0,17-0,5 ^a	1-10 ^a	0,5-1 ^a	0,17-0,5 ^a	1-10 ^a	0,5-1 ^a	0,17-0,5 ^a
B[a]A	18	19	19	19	19	20	16	15	14	13	15	14
CHRY	23	20	20	18	17	17	20	16	17	19	18	17
B[b]F	10	9	9	7	9	9	10	7	12	13	12	12
B[k]F	8	8	8	8	9	9	8	8	9	7	9	10
B[a]P	16	18	18	20	19	19	17	19	17	19	18	19
DB[ah]A	3	4	3	4	4	3	4	4	4	3	3	2
B[ghi]P	10	10	11	11	11	11	13	13	13	13	12	12
I[cd]P	12	12	12	13	12	12	12	14	14	13	13	14

^a - velikost PM frakcí [μm]

Tab. 3: Relativní distribuce k-PAU v EOM odvozené z PM o různém aerodynamickém průměru, v různých lokalitách.

Metabolická aktivace	8-OxodG/1000 m ³		8-OxodG/ μg PM	
	Průměr	SD	Průměr	SD
+S9	0,093	0,046	0,265	0,175
-S9	0,067	0,023	0,191	0,113
p	<0,01		<0,01	

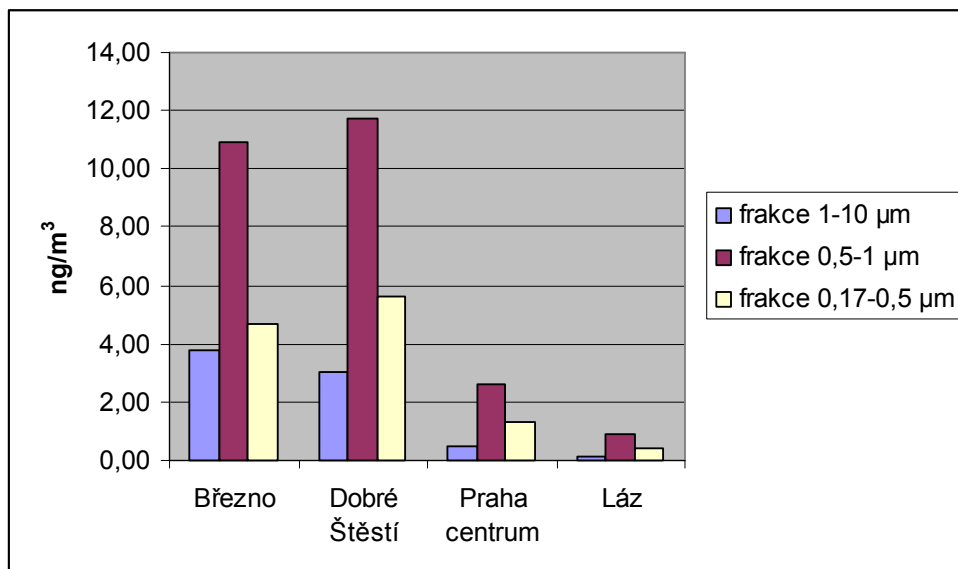
Tab. 4: Vliv S9 metabolické aktivace na oxidační kapacitu PM.

Metabolická aktivace	8-OxodG/1000 m ³		8-OxodG/ μg PM	
	Korelační koeficient (<i>R</i>)	<i>p</i>	Korelační koeficient (<i>R</i>)	<i>p</i>
+S9	0,70	<0,05	-0,33	0,30
-S9	0,52	0,08	-0,27	0,40

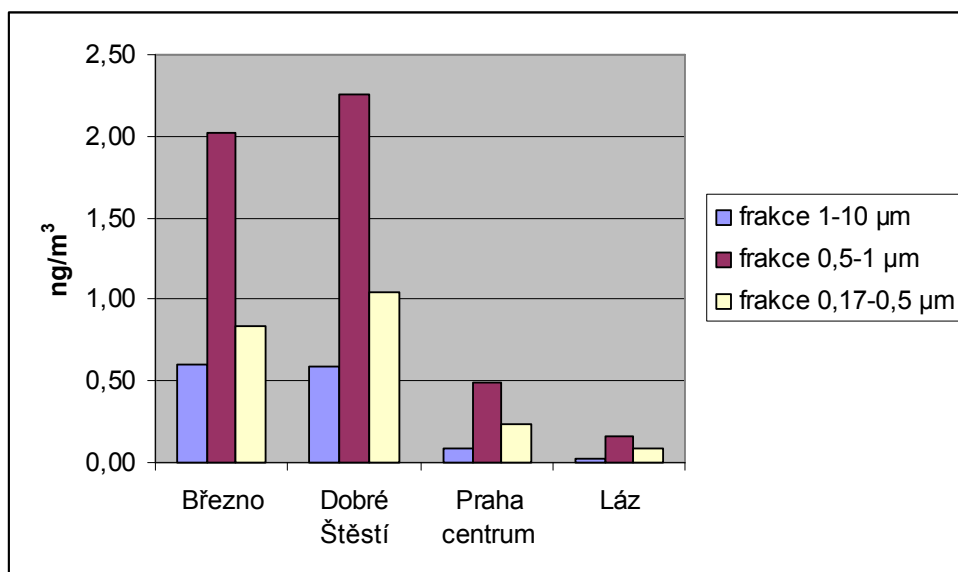
Tab. 5: Vztah mezi oxidačním poškozením DNA a obsahem k-PAU.

11. PŘÍLOHY: GRAFY

(A)

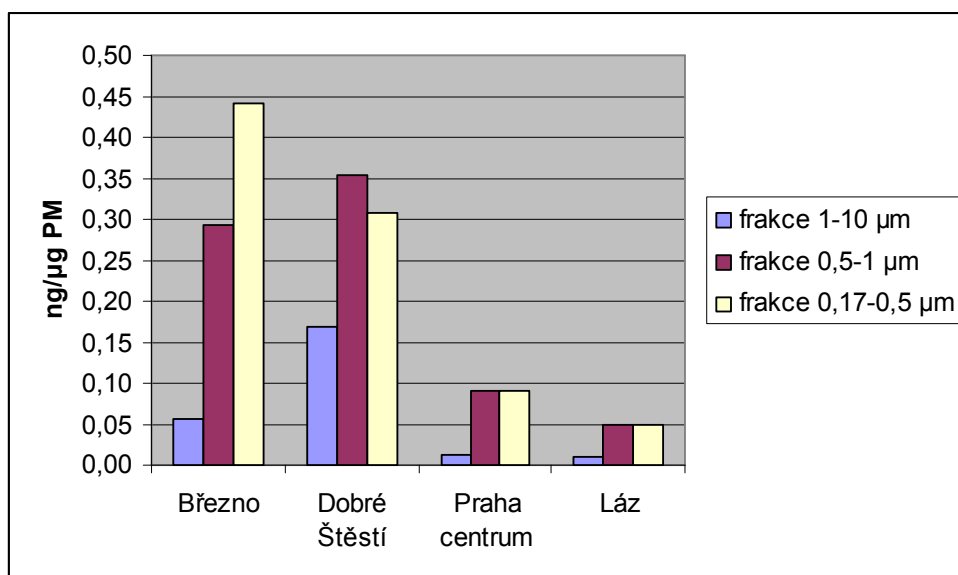


(B)

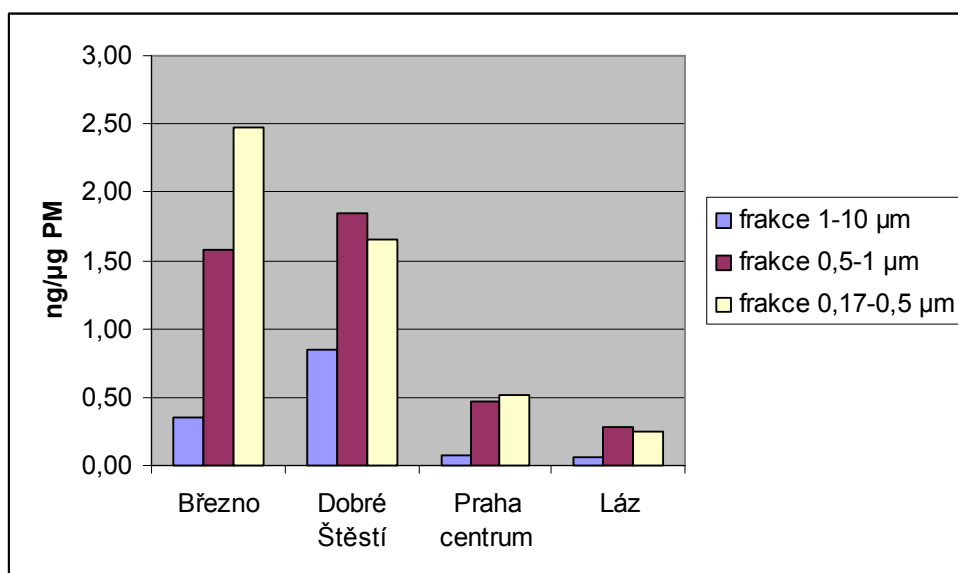


Graf 1: Koncentrace karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (k-PAU) (A) a benzo[a]pyrenu (B[a]P) (B) v jednotlivých lokalitách a frakcích.

(A)

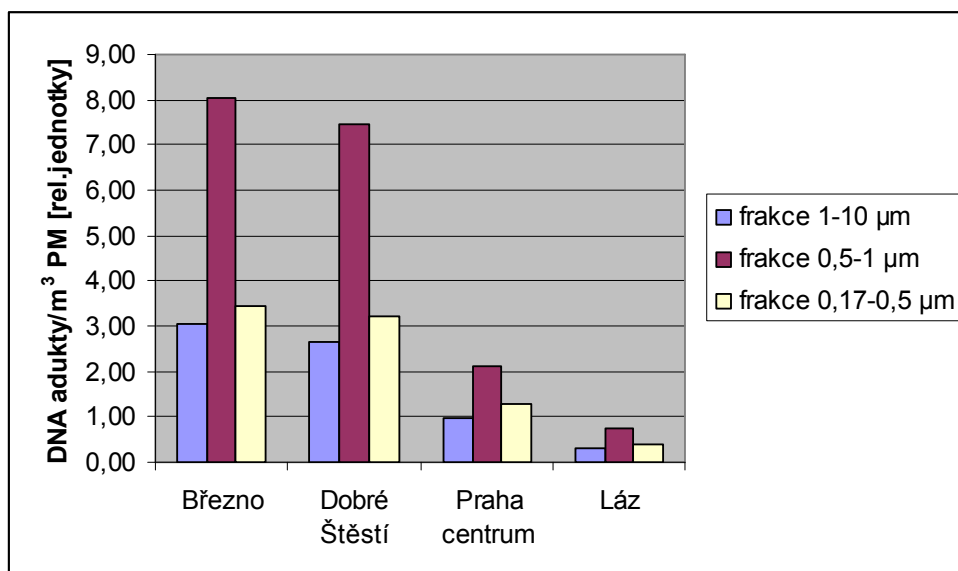


(B)

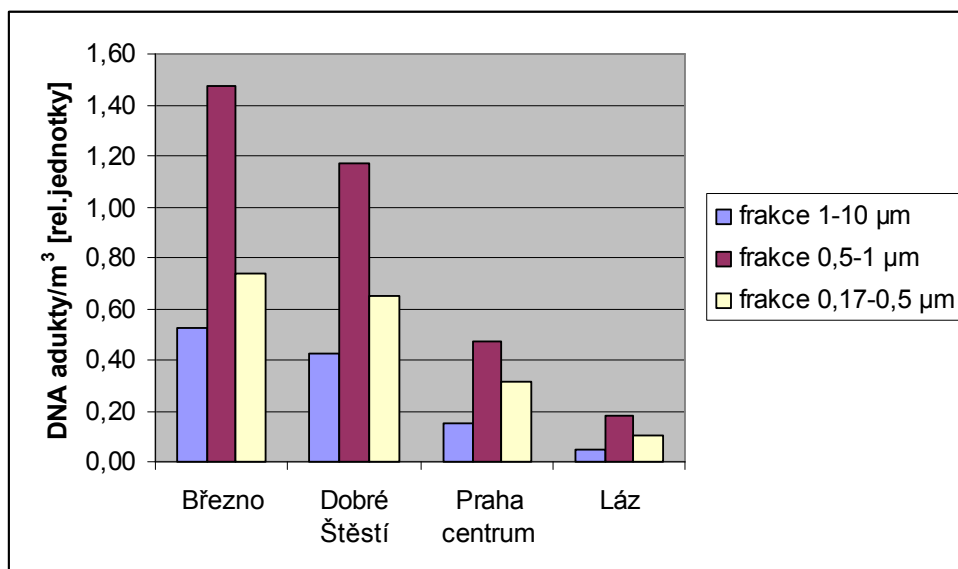


Graf 2: Hmotnosti B[a]P (A) a k-PAU (B) v aerosolu.

(A)

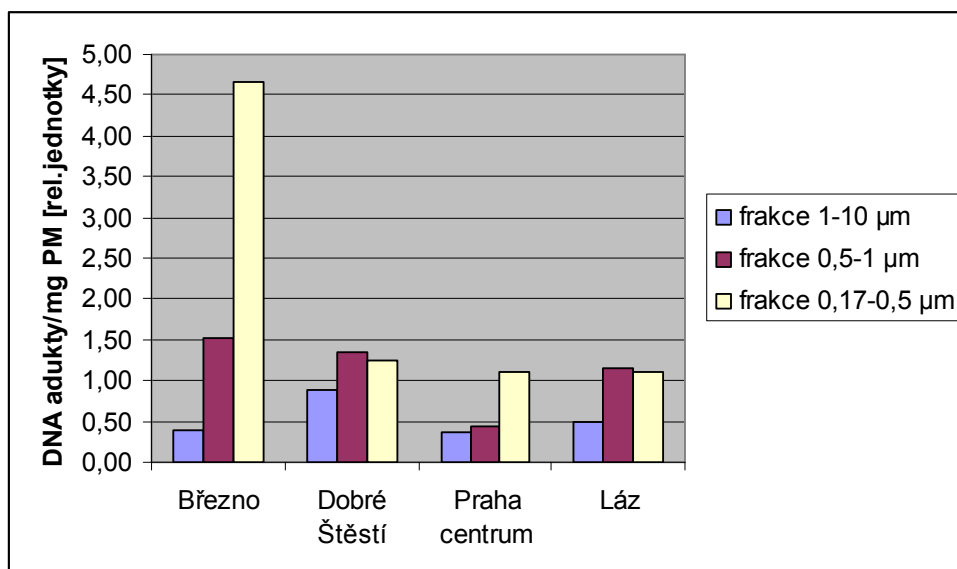


(B)

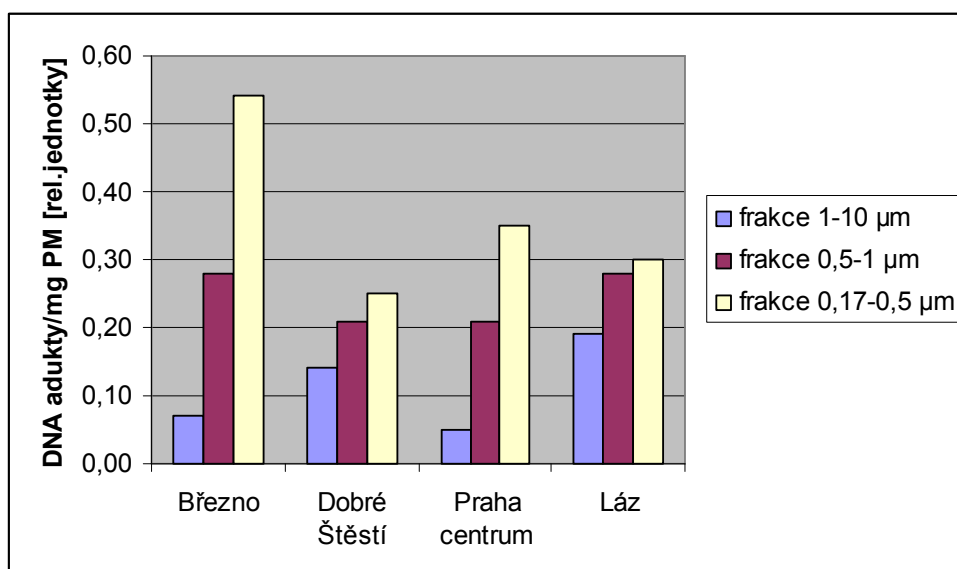


Graf 3: Celkové hladiny DNA aduktů indukované EOM získanou z aerosolů o různé velikosti v systému calf thymus DNA vztažené na m³ vzduchu. DNA adukty byly analyzovány s metabolickou aktivací (A) a bez metabolické aktivace (B).

(A)

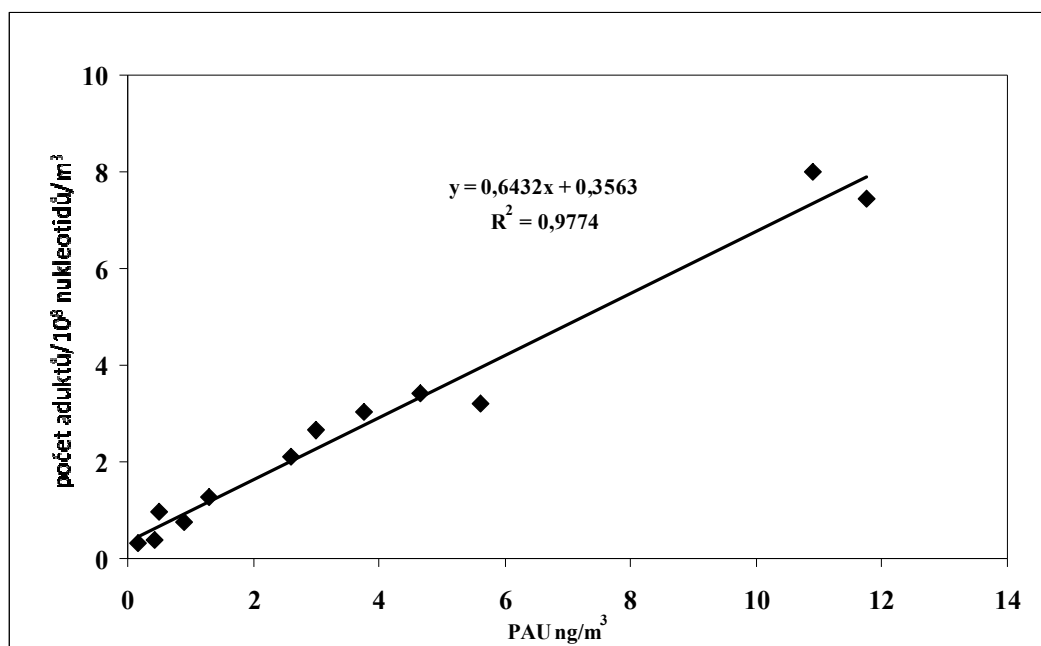


(B)

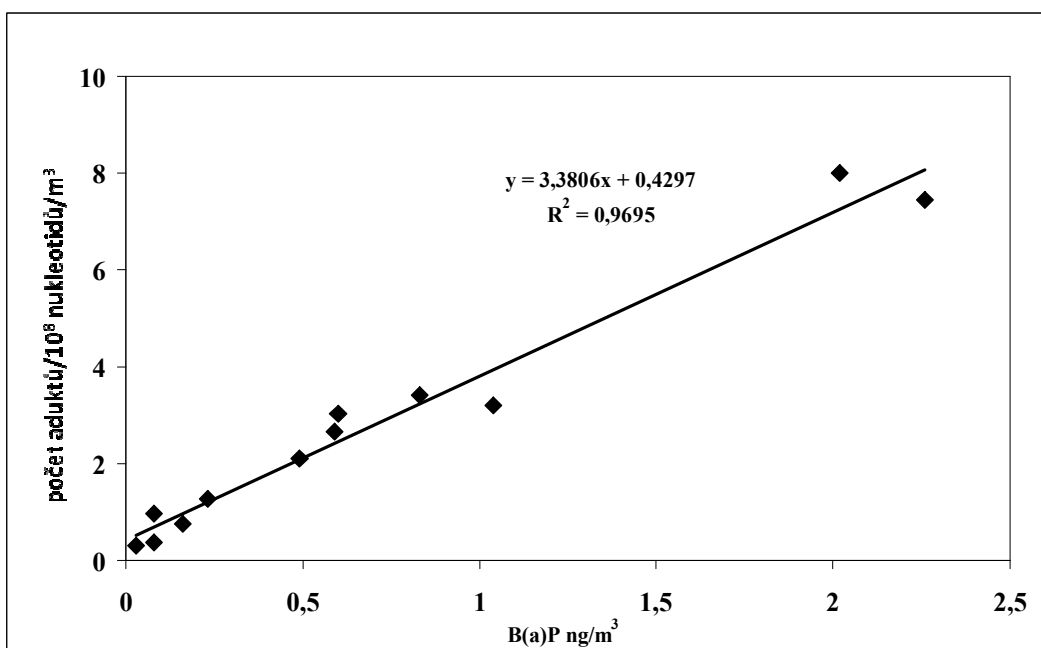


Graf 4: Celkové hladiny DNA aduktů indukované EOM získanou z aerosolů o různé velikosti v systému calf thymus DNA vztažené na mg PM. DNA adukty byly analyzovány s metabolickou aktivací (A) a bez metabolické aktivace (B).

(A)

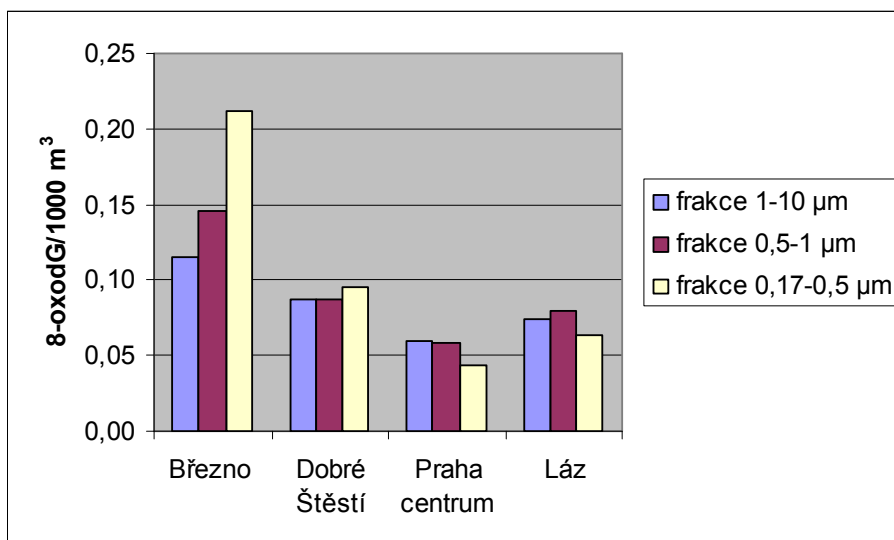


(B)

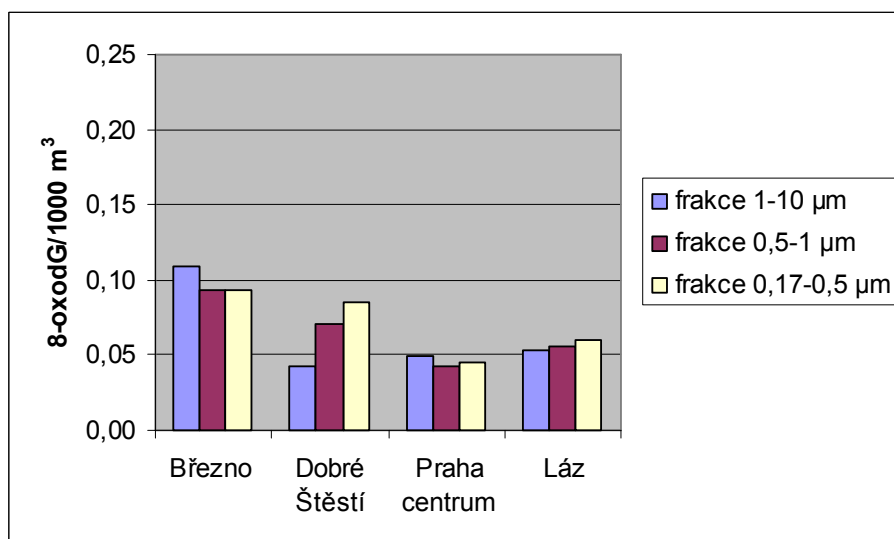


Graf 5: Korelace hladin DNA aduktů indukovaných extrakty z aerosolů s obsahem k-PAU (A) a B[a]P (B) pro jednotlivé lokality (Březno, Dobré Štěstí, Praha, Láz) a velikostní frakce (1-10 μm ; 0,5-1 μm ; 0,17-0,5 μm) v acelulárním systému calf thymus DNA (+S9 frakce).

(A)

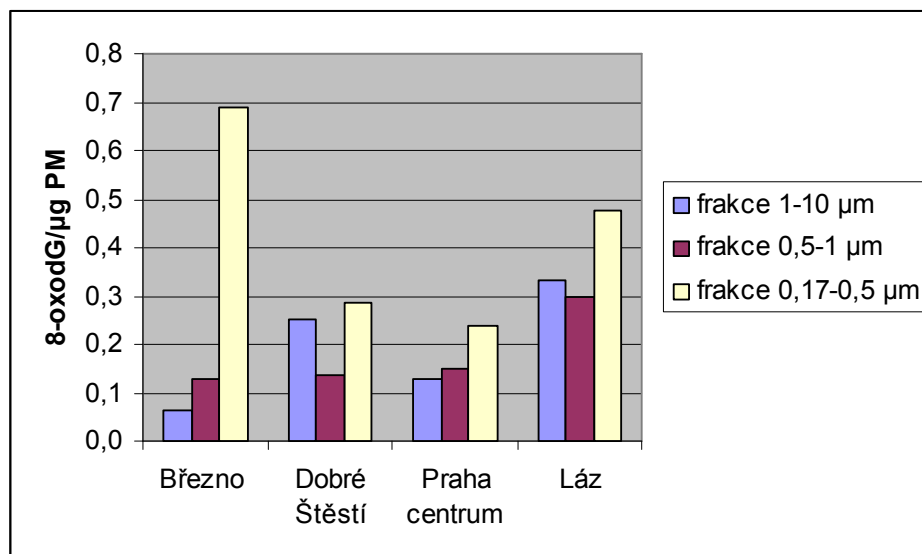


(B)

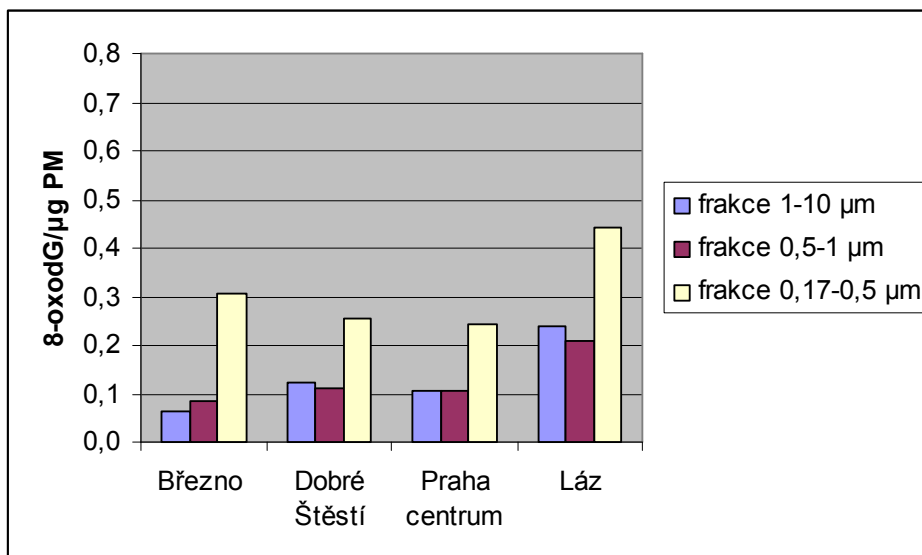


Graf 6: Průměrné hodnoty 8-oxodG/10⁵ dG na 1000 m³ vzduchu indukované v různých lokalitách různými velikostními frakcemi. (A) acelulární systém s calf thymus DNA inkubovaný v přítomnosti S9 frakce. (B) bez přítomnosti S9 frakce.

(A)

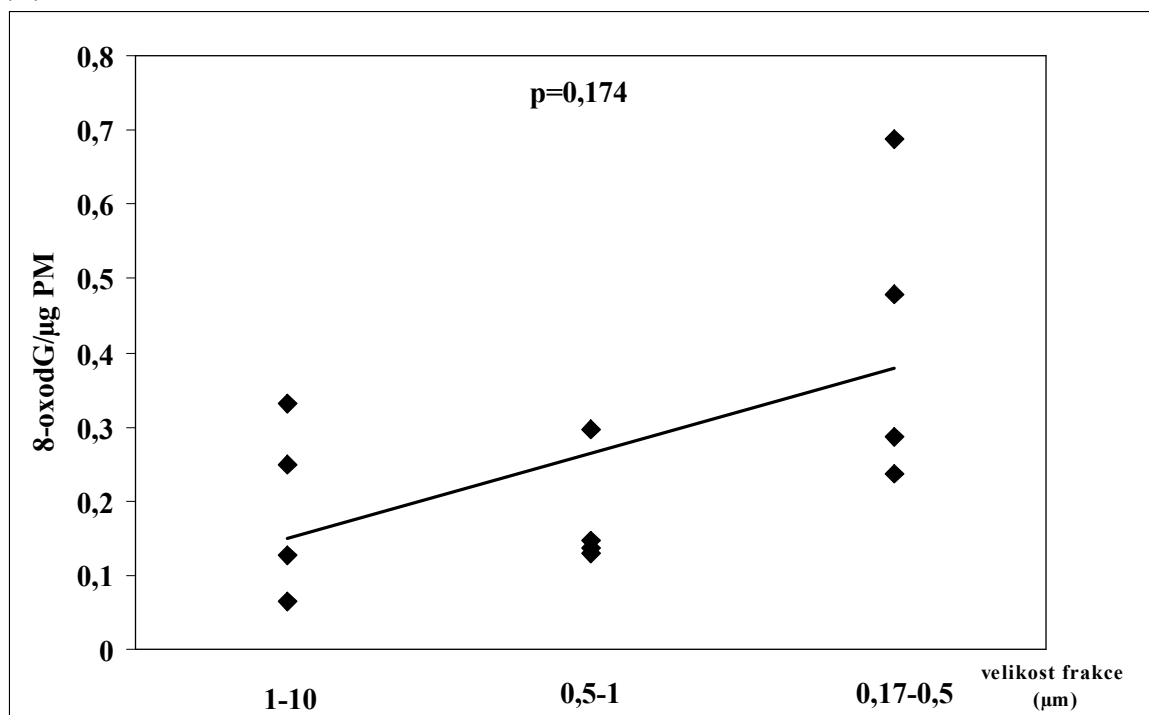


(B)

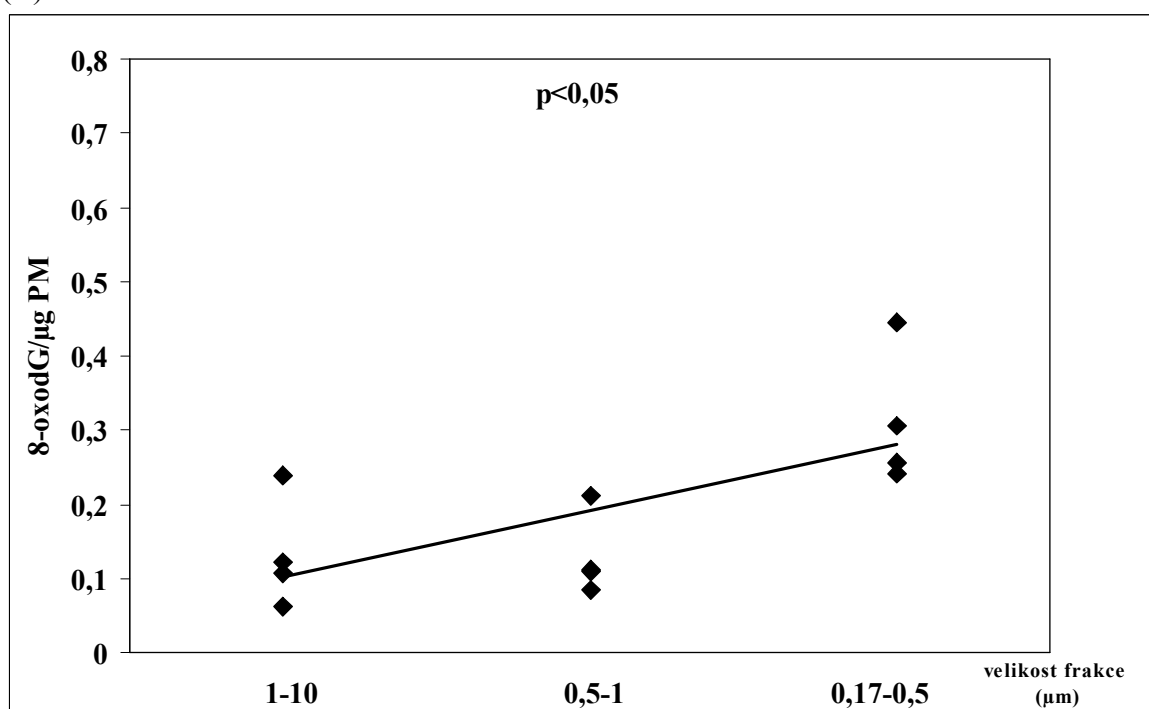


Graf 7: Průměrné hodnoty 8-oxodG/10⁵ dG na mikrogram PM indukované v různých lokalitách různými velikostními frakcemi. (A) acelulární systém s calf thymus DNA inkubovaný v přítomnosti S9 frakce. (B) bez přítomnosti S9 frakce.

(A)

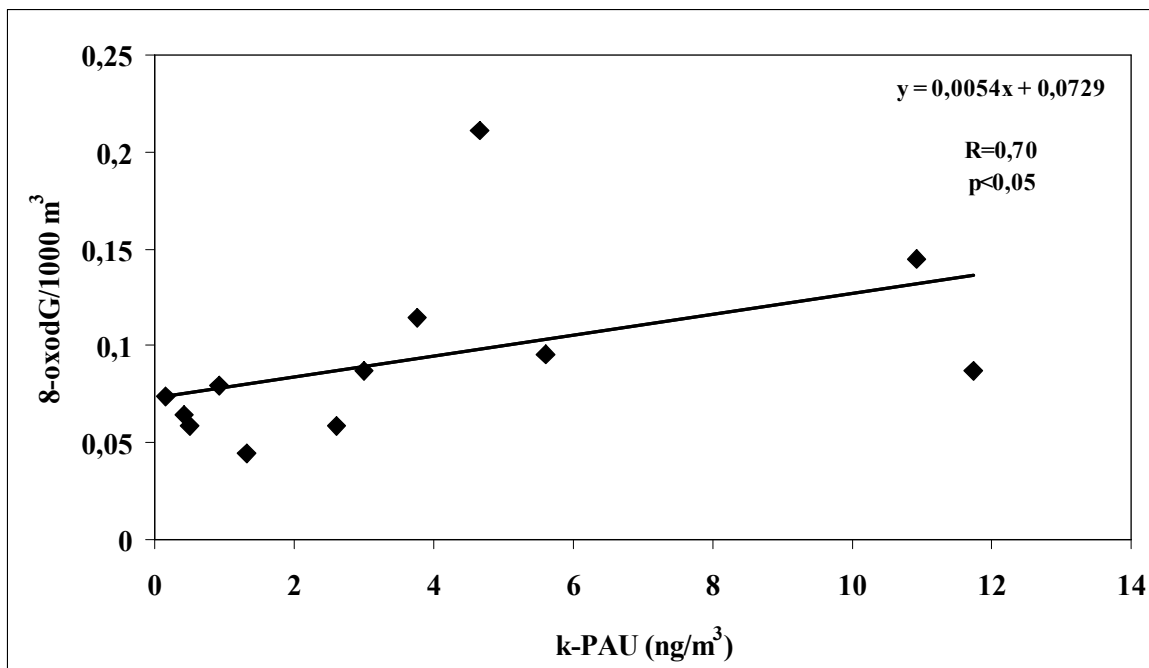


(B)

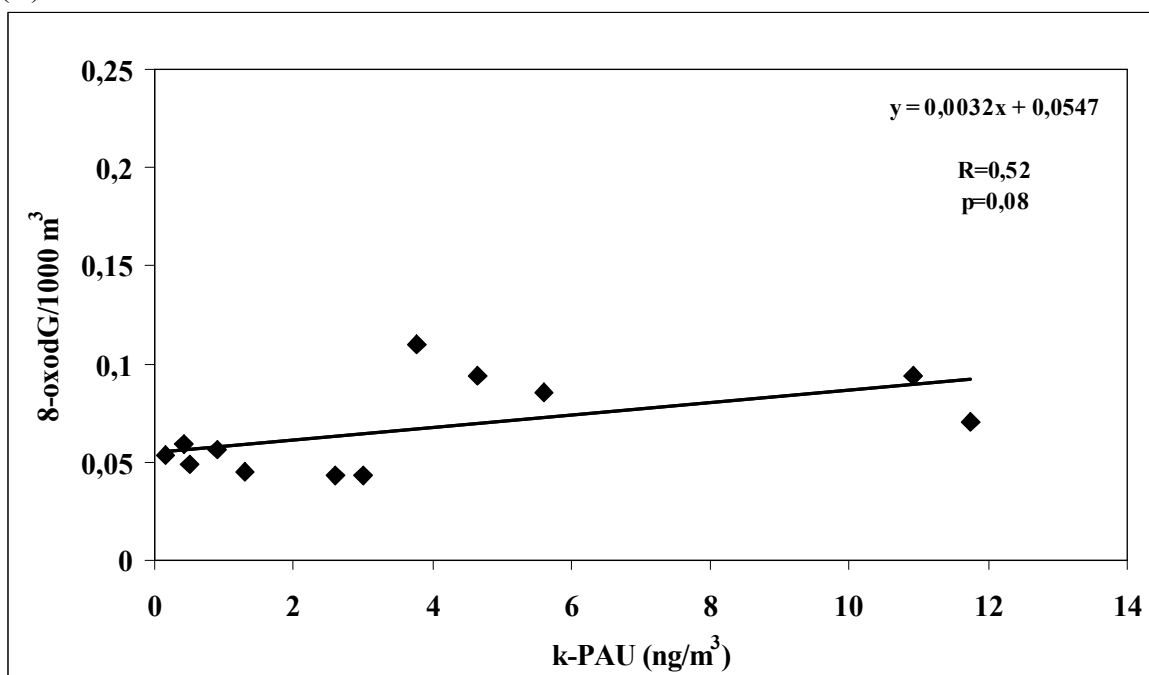


Graf 8: Efekt jednotlivých velikostních frakcí na hladiny 8-oxodG/ 10^5 dG vztažené na mikrogram PM. (A) acelulární systém s calf thymus DNA inkubovaný v přítomnosti S9 frakce. (B) bez přítomnosti S9 frakce.

(A)

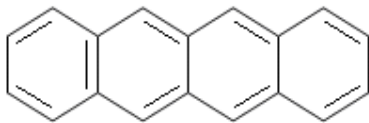


(B)

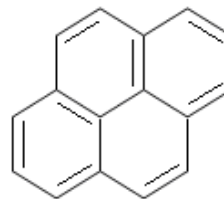


Graf 9: Korelace mezi obsahem k-PAU ve vzduchu a hladinami 8-oxodG/10⁵ dG na 1000 m³ vzduchu. (A) acelulární systém calf thymus DNA inkubovaný v přítomnosti S9 frakce. (B) bez přítomnosti S9 frakce.

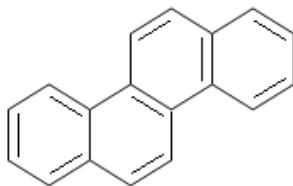
12. PŘÍLOHY: OBRÁZKY



lineárně anelované (tetracen)



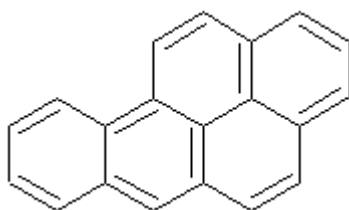
klastrové (pyren)



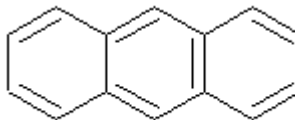
angulární (chrysen)

Obr. 1: Uspořádání kondenzovaných benzenových jader v molekule.

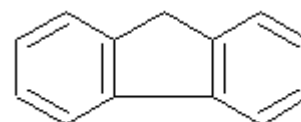
(http://old.chmi.cz/uoco/prj/vav_740_3_02/dp1dod.pdf)



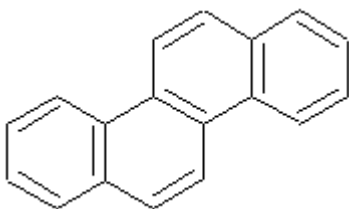
benzo[a]pyren



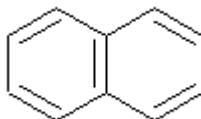
antracen



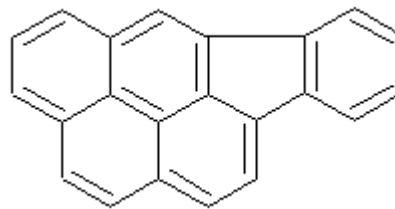
fluoranten



chrysen



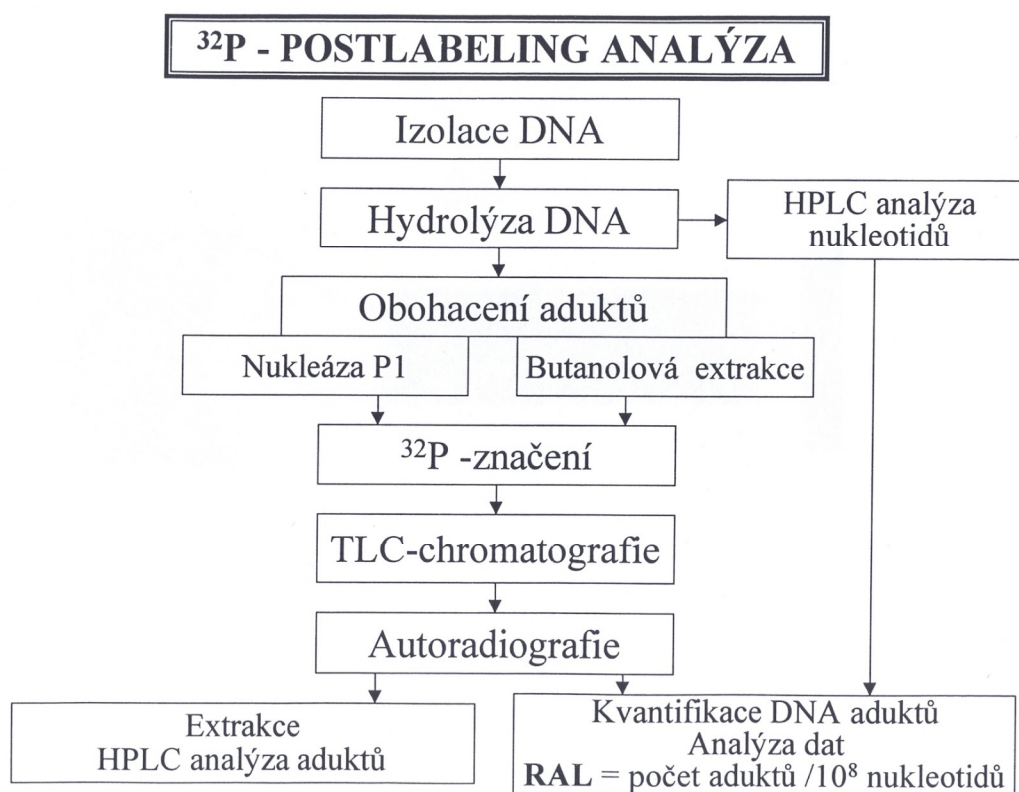
naftalen



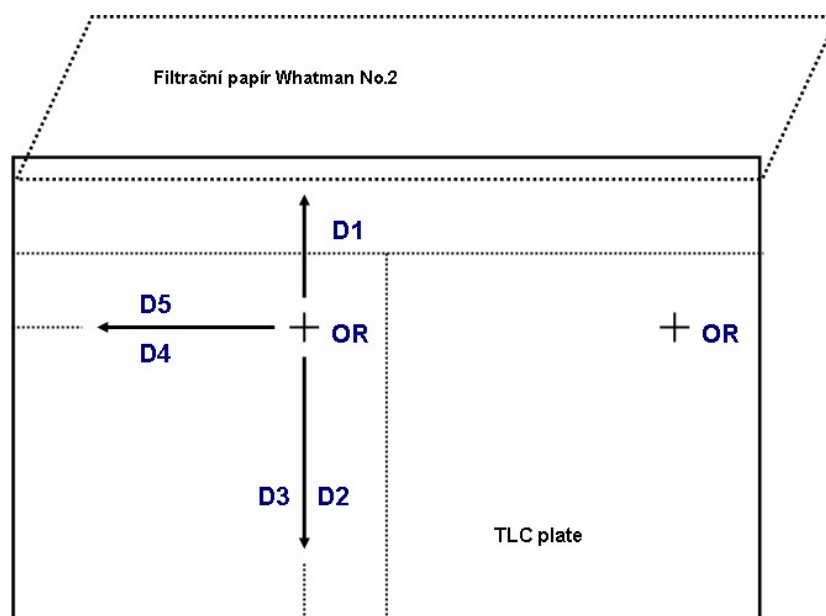
ideno[123cd]pyren

Obr. 2: Zástupci polycyklických aromatických uhlovodíků.

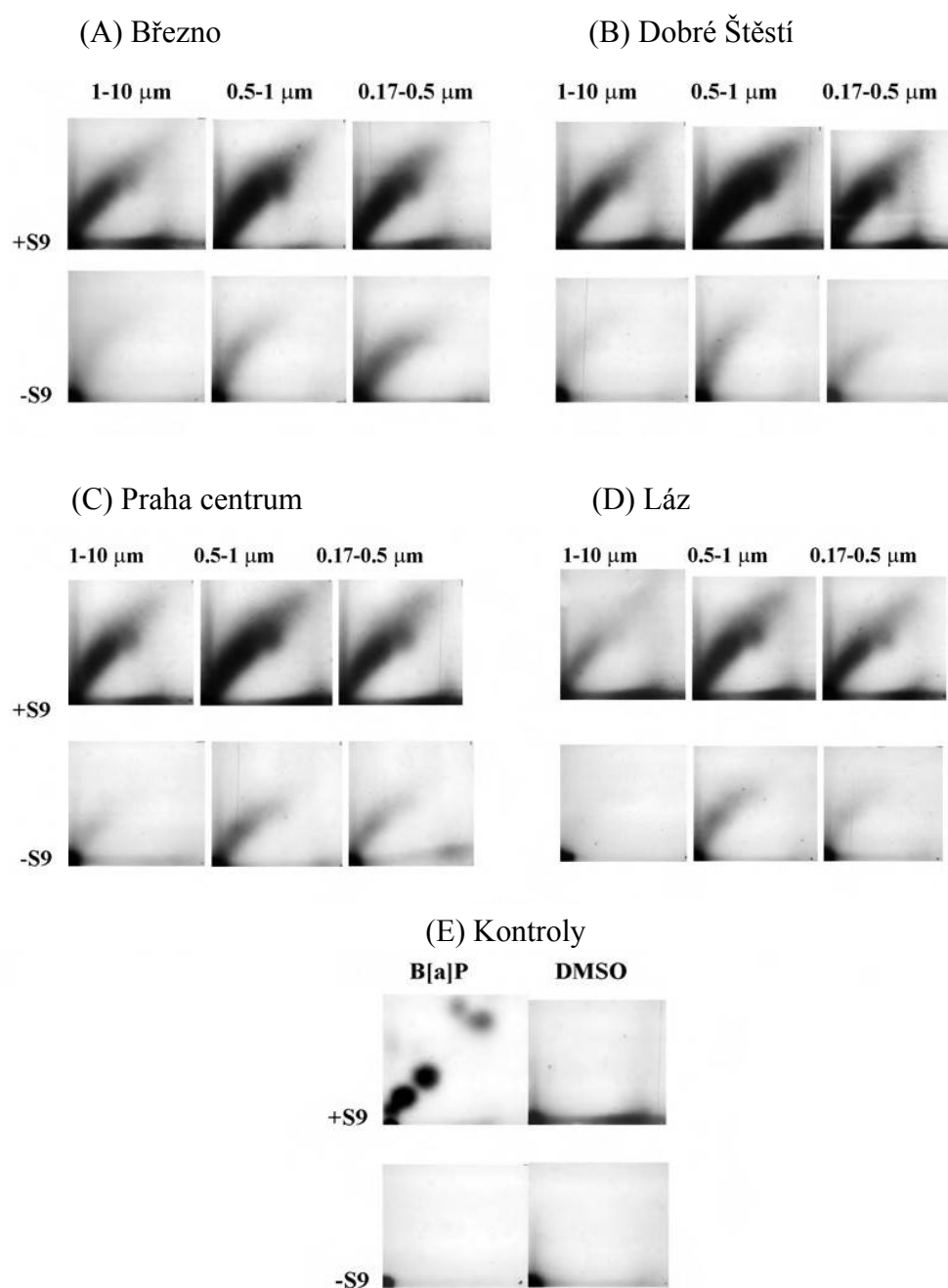
(<http://hplc1.sweb.cz/Kontaminant/pah.htm>)



Obr. 3: Princip stanovení DNA aduktů pomocí metody ³²P-postlabelingu.



Obr. 4: Vícerozměrná tenkovrstvá chromatografie (TLC) k separaci DNA aduktu. D1-D5 označují směry TLC. OR označuje počátek (origin).



Obr. 5: Autoradiogramy DNA aduktů indukovaných extrakty z prachových částic odebraných v jednotlivých lokalitách (A) Březno, (B) Dobré Štěstí, (C) Praha centrum, (D) Láz, (E) kontroly, v přítomnosti (+S9) a nepřítomnosti (-S9) jaterní mikrosomální frakce potkana. Doba expozice na film byla 12 h při -80°C .

